



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia  
Universidade Técnica de Lisboa**

**Análise molecular e fenotípica da virulência em estirpes de  
*Escherichia coli* isoladas de  
alimentos prontos-a-comer (RTE)**

**Suse Cristina Alves Guerreiro**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar**

Orientador: Professora Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Co-orientador: Licenciado Jorge Cândido Pinheiro da Costa Machado

**Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutor Jorge Cândido Pinheiro da Costa Machado, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Saúde  
Doutor Ricardo Jorge

Lisboa, 2012

## Agradecimentos

*If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.*

Isaac Newton

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Realizar uma tese de mestrado implica não só muito de nós como muito dos outros que estão à nossa volta e que, fundamentalmente, nos apoiam e nos servem de suporte ao longo das várias fases por que passamos. Se não nos pudéssemos apoiar nos “ombros de gigantes” seria, certamente, tudo mais complicado. Quero, então, expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que fizeram parte deste percurso, pois todos eles contribuíram, de certa forma, para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Luisa Brito, por ter despertado em mim o interesse pela área da Microbiologia e novos métodos moleculares de diagnóstico e pela competência científica e acompanhamento do trabalho, disponibilidade, generosidade, constante incentivo, paciência, amizade e carinho com que sempre me presenteou. Assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes, feitas durante a orientação.

À Mestre Ana Carla Silva, por toda a disponibilidade com que me ensinou com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela paciência, simpatia e amizade, que demonstrou ter para comigo ao longo deste trabalho.

Aos Mestres Paula Cabrita e António Lourenço, pelo apoio sempre que necessário, conhecimentos transmitidos, incentivo, ajuda e amizade.

À Mestre Mara Pereira, pelo incansável apoio moral, pela amizade, força e carinho que sempre demonstrou para comigo.

Ao Doutor Mahesh Chandra pelo apoio e motivação, pelas conversas animadas e pela lição de vida. Obrigada pelas palavras certas nos momentos certos.

Aos colegas do laboratório, principalmente à Ana Filipa Abrunhosa e Henrique Machado, agora Mestres, pela ajuda, carinho, motivação e sentido de humor.

À D. Lena e D. Manuela pela ajuda e paciência com que todos os dias me preparavam o material. Obrigada pela disponibilidade e pela compreensão dos meus horários, nem sempre fáceis.

Neste Laboratório de Microbiologia encontrei, mais que colegas, verdadeiros amigos. Sempre dispostos a ajudar-me e a apoiar-me. Obrigada a todos vós, novamente, sinto-me uma pessoa mais completa por vos ter conhecido.

À Professora Doutora Filomena Caeiro, da Faculdade de Ciências de Lisboa, por me ter cedido tão gentilmente a linha celular Vero e se ter mostrado sempre disponível para qualquer esclarecimento, sempre com disposição de ajudar prontamente. Obrigada pela simpatia e carinho com que me recebeu.

Ao Laboratório de Genética, principalmente à Mestre Edna Ribeiro, pelos conhecimentos transmitidos na área da observação microscópica de células animais, pela constante ajuda, disponibilidade e simpatia.

Ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, particularmente ao departamento de Doenças Infeciosas. Ao meu co-orientador Dr. Jorge Machado e à sua equipa, obrigada por toda a disponibilidade e ajuda.

Às minhas colegas e amigas Avril Chiché, Paula Gomes, Rita Alvarenga e Mónica Assunção, por todas as situações que vivemos: pela aprendizagem, risos, zangas, ajuda, carinho, compreensão, apoio e amizade, num grupo que se manteve unido ao longo de todos os trabalhos propostos no Instituto Superior de Agronomia.

Obrigada a todos os meus amigos que contribuem diariamente para a minha felicidade, agradeço-vos pelo apoio e motivação que me transmitem. Especialmente a vós, Eliana Santos, Cátia Seixas, Carolina Camacho, Carina Pacheco, Fátima Henriques, Hugo Escola, Daniel Guerreiro, Fabricio Neves, Elisa Belga, Patrícia Motrena e Dania Viana, obrigada por serem pessoas maravilhosas e por fazerem parte da minha vida.

Ao Miguel, por todo o incentivo, motivação, carinho, amor e paciência nesta etapa mais complicada, e por me lembrar, sempre, que sou capaz.

E por último, mas com maior importância, agradeço à minha família, que sempre esteve presente e que me apoia incondicionalmente. Especialmente a vós pai, mãe, irmã, tio Vítor, tia Bela e avó Angélica, obrigada por tudo o que representam para mim e por me apoiarem sempre.

E a ti avô Filipe que, onde quer que estejas, estarás sempre presente na minha vida. Que o melhor que faça, seja sempre dedicado a ti.

A todos, mesmo aos quais não mencionei, muito obrigada!

## Resumo

As bactérias *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) são uma importante causa de doenças gastrointestinais. As DEC são classificadas em: enteropatogênicas, enterohemorrágicas, enterotoxinogênicas, enteroagregativas, enteroinvasivas e de aderência difusa, em função da presença de determinados fatores de virulência. As toxinas LT, ST, EAST1 e VT são codificadas pelos genes *lt*, *st*, *astA* e *stx*, respectivamente. A intimina, codificada pelo gene *eae*, provoca a lesão A/E (*attaching and effacing*), que favorece a aderência íntima das bactérias ao intestino, sendo também um importante fator de patogenicidade.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a virulência de 36 isolados de *E. coli* de alimentos prontos-a-comer (RTE) através da pesquisa dos genes *stx*, *lt*, *st*, *astA* e *eae* (Multiplex PCR) e por medição da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e observação microscópica (contraste de fase e DAPI) de células Vero, quando expostas às toxinas. Cinco isolados apresentaram o gene *stx*, um dos quais também amplificou o *eae*, quatro isolados, o *lt* e três, o gene *st*. Os ensaios de citotoxicidade e a análise microscópica de células Vero validaram os resultados obtidos por Multiplex PCR, sendo que os isolados *stx*<sup>+</sup> induziram maior liberação ( $p \leq 0,05$ ) de LDH (19,9 a 32%) que os isolados *stx*<sup>-</sup> (4,6 a 9,1%), tendo os primeiros provocado extensos efeitos citopáticos.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, citotoxicidade, células Vero, fatores de virulência, Multiplex PCR, alimentos prontos-a-comer.

## Abstract

The bacteria *Escherichia coli* diarrheagenic (DEC) are an important cause of gastrointestinal diseases. The DEC are classified into: enteropathogenic, enterohaemorrhagic, enterotoxigenic, enteroaggregative, enteroinvasive and diffusely adherent, due to the presence of certain virulence factors. The toxins LT, ST, EAST1 and VT are encoded by the genes *lt*, *st*, *astA* and *stx*, respectively. The intimin, encoded by the gene *eae*, causes the A/E lesions (attaching and effacing), which favors the adherence of bacteria to the intestine, being also an important factor of pathogenicity.

This study was aimed to evaluate the virulence of 36 isolates of *E. coli* from ready-to-eat (RTE) food, by investigating the presence of the *stx*, *lt*, *st*, *astA* and *eae* genes (Multiplex PCR) and by measuring the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) from Vero cells and microscopic observation (phase contrast and DAPI) of these cells, exposed to bacterial toxins. Five isolates showed the *stx* gene, one of which also amplified the *eae*, four isolates, the *lt* gene and three, the *st*. Cytotoxicity tests and microscopic analysis of exposed Vero cells validate the results obtained by multiplex PCR, being that the isolates *stx*<sup>+</sup> induced higher release ( $p \leq 0.05$ ) of LDH (19.9 a 32%) than the isolates *stx*<sup>-</sup> (4.6 a 9.1%), having the first ones caused extensive cytopathic effects.

**Key words:** *Escherichia coli*, cytotoxicity, Vero cells, virulence factors, Multiplex PCR, Ready-To-Eat (RTE) food.

## Extended Abstract

*Escherichia coli* is a bacteria that is part of the most abundant facultative anaerobes of the intestinal microbiota, colonizing the human gastrointestinal tract soon after birth. The pathogenicity of certain strains of *E. coli* is related to the acquisition of specific virulence attributes, which confers an increased ability to adapt to new niches and allows them to cause a broad spectrum of diseases.

The *E. coli* diarrheagenic (DEC) can be grouped into six main categories: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and diffusely adherent *E. coli* (DAEC). These categories are based on its pathogenesis, clinical manifestations and presence of specific virulence factors, including the production of toxins and non-fimbrial adhesin (AfaE), such as the protein intimin, responsible for the A/E lesion (attaching and effacing), which is encoded by the *eae* gene, present in the LEE pathogenicity island. The heat-labile enterotoxins (LT) and the heat-stable enterotoxin (ST) are produced by ETEC strains. The genes responsible for the production of these enterotoxins, *lt* and *st*, respectively, are generally encoded by plasmids. They are a class of oligomeric toxins that are closely related, in structure and mode of operation, with cholera enterotoxin, expressed by *Vibrio cholerae*. EAST1 enterotoxins are mainly produced by EAEC strains, however other DEC strains can produce it, especially ETEC and EHEC. This toxin, encoded by the *astA* gene, is genetically and immunologically distinct from the toxin ST, produced by ETEC, but somehow similar regarding the mechanism of action on the host cells. The VT toxin, encoded by *stx* gene, is the major virulence factor of EHEC strains. This toxin is quite similar to the type 1 toxin produced by *Shigella dysenteriae*, therefore it has also been designated Shiga like toxin (Stx).

The identification of *E. coli* in the Food Industry is of great importance, because the fecal contamination of foods and drinks constitutes one of the gravest public health problems.

The objective of this work was the implementation of a new line of study in *E. coli*, at the Laboratory of Microbiology of ISA, regarding the evaluation of the virulence of this bacteria. To accomplish this, 36 isolates of ready-to-eat (RTE) foods and seven reference strains were used. The Multiplex PCR protocol, routinely used in the National Reference Laboratory of Gastrointestinal Infections (INSA) was adapted to detect the presence of the genes *stx*, *lt*, *st* and *astA* which encode the toxins VT (Stx), LT, ST and EAST1, respectively, and the *eae* gene that encodes intimin. Simultaneously, the cytotoxicity of these bacteria was evaluated by measuring the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), in Vero exposed cells and by microscopic observation of these cells based on phase contrast and DAPI staining.

In a preliminary analysis, phenotypic tests were performed which allowed to confirm the purity of the *E. coli* cultures. Four of the RTE isolates, showed no staining of colorless colonies onto CT-SMAC and TBX, indicating that these strains are, most likely, O157: H7.

The Multiplex PCR analysis proved to be specific and sensitive approach for the detection of *stx*, *lt*, *st*, *astA* and *eae* genes, in DEC (diarrhoeagenic *E. coli*) strains. In five out of the 36 RTE isolates analyzed, the presence of *stx* gene was observed, and in one of these the *eae* gene was also present. In four isolates the *lt* gene was present and in three the *stx* gene was amplified.

Cytotoxicity tests and microscopic analysis of Vero cells validated the results obtained by Multiplex PCR. In the cytotoxicity tests, it was found that the *stx*<sup>+</sup> strains induced higher release ( $p \leq 0.05$ ) of LDH (19.9 a 32%) than the *stx*<sup>-</sup> isolates (4.6 a 9.1%). The higher values measured for the *stx*<sup>+</sup> strains, corresponded mainly to strains that are associated with the presence of other virulence factors, namely from *lt*, *st*, and *astA* genes. Microscopic analysis revealed that *stx*<sup>+</sup> strains caused extensive cellular damage in Vero cells, affecting their morphological and structural characteristics, including breakdown of the membrane, loss of ability to adhere on confluent monolayer, decrease in cell size and loss of the characteristic form, arrest of mitosis, nuclear changes and death. For *stx*<sup>-</sup> strains no visible cytopathic effects were observed, when compared to no exposed Vero cells. Strains *lt*, *st* and *astA* positive did not cause relevant cell damage.

The presence of virulent strains of *E. coli* is a concern for the Food Industry, since their presence in foods, especially in RTE, constitutes a substantial threat to public health. The Food Industry must continue to implement, on an ongoing basis, all necessary procedures for the prevention and eradication of these pathogenic bacteria from food and facilities.

## Índice Geral

Índice Geral .....	I
Índice de Quadros.....	V
Índice de Figuras .....	VI
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	VII
1. Introdução.....	1
1.1. Caracterização de <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.2. Patótipos, principais fatores de virulência e patogénese .....	3
1.2.1. EPEC: <i>E. coli</i> enteropatogénica.....	6
1.2.2. EHEC: <i>E. coli</i> enterohemorrágica.....	10
1.2.3. ETEC: <i>E. coli</i> enterotoxinogénica.....	11
1.2.4. EAEC: <i>E. coli</i> enteroagregativa.....	12
1.2.5. EIEC: <i>E. coli</i> enteroinvasiva.....	13
1.2.6. DAEC: <i>E. coli</i> de aderência difusa .....	15
1.2.7. Toxinas.....	16
A) Enterotoxinas .....	16
B) Verotoxina.....	19
1.2.8. Epidemiologia e doença.....	20
1.3. <i>Escherichia coli</i> na Indústria Alimentar.....	23
1.4. Isolamento e identificação <i>E. coli</i> .....	26
1.4.1. Inoculação em meios diferenciais e métodos bioquímicos.....	26
1.4.2. Tipificação serológica .....	28
1.4.3. Multiplex PCR.....	29
1.5. Métodos de avaliação fenotípica da virulência – ensaios <i>in vitro</i> .....	31
1.6. Enquadramento e objetivos do trabalho.....	33
2. Materiais e Métodos .....	34
2.1. Estirpes bacterianas utilizadas.....	34
2.2. Linha celular animal Vero .....	36
2.3. Meios de cultura .....	36
2.3.1. Meios líquidos.....	36



A) BHI.....	36
B) D-MEM.....	36
2.3.2. Meios sólidos.....	38
A) TSA-YE.....	38
B) CT-SMAC .....	38
C) TBX Agar .....	38
D) Agar de citrato.....	38
E) MRVP .....	39
2.4. Soluções .....	39
2.4.1. Manutenção da linha celular .....	39
A) Tripsina – Versène .....	39
B) Inativação do soro fetal bovino (SFB) .....	39
C) Soro fisiológico tamponado .....	40
D) Solução mistura de Penicilina e Estreptomicina (200x).....	40
E) Solução de L-glutamina (100x).....	40
F) Solução de corante de azul de tripano 0,4% (m/v) .....	40
2.4.2. Testes morfológicos e bioquímicos .....	41
A) Água peptonada.....	41
B) Solução de vermelho de metilo.....	41
C) Solução de $\alpha$ -naftol 5% (m/v) .....	41
D) Solução de creatina 40% (m/v).....	41
2.4.3. Ensaio de citotoxicidade.....	41
A) Solução de sulfato de polimixina B .....	41
B) Solução de gelatina 0,2% (m/v) .....	42
C) Solução de PBS 10x e 1x .....	42
D) Solução de EGTA.....	42
E) Solução de fixação com paraformaldeído .....	42
F) Solução de SSC 20x.....	43
2.4.4. Multiplex PCR.....	43
A) TBE 1x.....	43

B) Solução de agarose 2% (m/v).....	43
2.5. Condições de cultura e de manutenção .....	44
2.5.1. Estirpes bacterianas .....	44
2.5.2. Linha celular animal Vero.....	44
A) Tripsinização da linha celular Vero .....	45
B) Contagem e avaliação da viabilidade das células Vero.....	46
C) Conservação por congelação .....	46
2.6. Caracterização fenotípica dos isolados de <i>E. coli</i> : testes morfológicos e bioquímicos .....	47
A) Meios seletivos diferenciais .....	47
B) Coloração de Gram .....	48
C) Testes IMViC .....	48
D) Oxidase e Catalase .....	49
2.7. Curva de calibração ( $A_{600\text{ nm}} / \text{UFC.mL}^{-1}$ ).....	49
2.8. Ensaio de citotoxicidade .....	50
2.8.1. Ensaio colorimétrico com base na medição da LDH.....	50
A) Preparação das microplacas P96 .....	51
B) Extração das toxinas .....	52
C) Colocação das toxinas nos tapetes celulares.....	52
D) Determinação dos valores de absorvância a 490 e a 650 nm .....	54
2.8.2. Pesquisa de efeitos citopáticos por observação microscópica .....	54
A) Preparação das lamelas.....	54
B) Crescimento das células Vero em lamela .....	55
C) Extração das toxinas e infecção do tapete celular .....	56
D) Observação em contraste de fase .....	56
E) Observação dos núcleos celulares por coloração de DAPI .....	56
2.9. Multiplex PCR .....	57
2.9.1. Preparação da amostra .....	57
2.9.2. <i>Primers</i> utilizados .....	57
2.9.3. Reação de amplificação .....	59
2.9.4. Visualização e análise dos produtos amplificados.....	60

2.10. Análise estatística dos resultados .....	60
3. Resultados e Discussão .....	61
3.1. Ensaio preliminar .....	61
A) Curva de calibração ( $A_{600\text{ nm}} / \text{UFC.mL}^{-1}$ ).....	61
B) Concentração de células Vero a utilizar nos ensaios de citotoxicidade.....	61
3.2. Caracterização fenotípica dos isolados de <i>E. coli</i> : análise morfológica e bioquímica .....	62
3.3. Multiplex PCR .....	65
3.4. Ensaio de citotoxicidade .....	69
3.5. Observação microscópica de efeitos citopáticos .....	72
4. Conclusões .....	78
5. Referências Bibliográficas.....	82
Anexo I – Alinhamento das sequências dos <i>primers</i> EAE23F e EAE25R com a sequência do gene <i>eae</i> presente nas estirpes <i>E. coli</i> TW14359 e EC4115 .....	107
Anexo II – Marcadores moleculares utilizados no Multiplex PCR .....	108
Anexo III – Representação gráfica da lactato desidrogenase (LDH) libertada para o meio extracelular no ensaio de citotoxicidade para detetar <i>E. coli</i> VTEC usando células Vero, em $A_{490-650\text{ nm}}$ e em percentagem.....	109

## Índice de Quadros

Quadro 1 – Descrição das estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas .....	34
Quadro 2 – Composição do meio de cultura D-MEM .....	37
Quadro 3 – Composição da solução de ATV .....	39
Quadro 4 – Composição da solução de soro fisiológico tamponado.....	40
Quadro 5 – Constituição da solução de PBS 10x .....	42
Quadro 6 – Composição da solução de SSC 20x.....	43
Quadro 7 – Características dos <i>primers</i> utilizados no <i>Multiplex PCR</i> .....	58
Quadro 8 – Composição da mistura de amplificação (para uma reação de 25 mL) .....	59
Quadro 9 - Ciclos de tempo e temperatura do Multiplex PCR .....	59
Quadro 10 – Resultados obtidos em meios seletivos diferenciais, Multiplex PCR e ensaios de citotoxicidade (LDH libertada por células Vero) .....	63

## Índice de Figuras

Figura 1 – Antígenos do fator de colonização (CFA) de <i>E. coli</i> : fímbrias ou fibrilas.....	4
Figura 2 – Esquema representativo das categorias DEC: EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC e DAEC..	5
Figura 3 – Aderência localizada (AL) de EPEC às células hospedeiras, na linha celular HEp-2. ....	6
Figura 4 – Aderência íntima (AI) e lesão A/E observada no intestino delgado após inoculação oral de estirpes EPEC em leitões de laboratório. ....	7
Figura 5 - Translocação das Esps (EPEC - <i>secreted proteins</i> ) através do sistema de secreção tipo III ..	8
Figura 6 – Aderência íntima e Lesão A/E provocada pela estirpe O157:H7 (EHEC) inoculada no íleo de cabras em laboratório.....	10
Figura 7 – Aderência agregativa (AA) que define EAEC.....	12
Figura 8 – Interação de EAEC com o epitélio intestinal.....	13
Figura 9 – Interação de EIEC com as células epiteliais.....	14
Figura 10 – Aderência difusa (DA) que define DAEC, na linha celular HEp-2.....	15
Figura 11 – Interação de DAEC com as células epiteliais. ....	16
Figura 12 – Separação das células tripsinizadas por movimentos de aspiração e retração em pipeta..	45
Figura 13 – Crescimento de <i>E. coli</i> nos meios CT-SMAC e TBX.....	47
Figura 14 – Princípio do ensaio colorimétrico de quantificação da atividade da LDH.....	50
Figura 15 - Disposição dos isolados de <i>E. coli</i> e controlos utilizados nos ensaios de citotoxicidade em microplaca P96. ....	53
Figura 16 – Suporte metálico para lavagem das lamelas.....	55
Figura 17 – Curva de Calibração ( $A_{600\text{ nm}}$ / UFC.mL <sup>-1</sup> ) para <i>Escherichia coli</i> B (CBISA 3965) em BHI...	61
Figura 18 – Padrão de amplificação dos genes de virulência ( <i>stx</i> , <i>st</i> , <i>lt</i> , <i>eae</i> e <i>astA</i> ) dos isolados de <i>E. coli</i> em gel de agarose a 2 % (m/v). ....	66
Figura 19 – Análise dos efeitos citopáticos causados pelas verotoxinas extraídas das estirpes de <i>Escherichia coli</i> em células Vero, em contraste de fase e em coloração de DAPI. ....	73

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

<b>A</b>	Absorvância
<b>A/E</b>	<i>Attaching and effacing lesion</i>
<b>AA</b>	Aderência agregativa
<b>AAF</b>	<i>Aggregative adherence fimbriae</i> (fímbria de aderência agregativa)
<b>AD</b>	Aderência difusa
<b>AfaE</b>	<i>Afimbrial-Adhesin Encoding</i> (adesina não fimbrial)
<b>AI</b>	Aderência íntima
<b>AL</b>	Aderência localizada
<b>APEC</b>	<i>Avian pathogenic Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> patogénica aviária)
<b>astA</b>	Gene que codifica a toxina EAST1
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATV</b>	Tripsina-Versène
<b>a<sub>w</sub></b>	Atividade da água
<b>BCIG</b>	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronic acid</i>
<b>BFP</b>	<i>Bundle-forming pilus</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>Caco-2</b>	Células de carcinoma do cólon humano
<b>cAMP</b>	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<b>CBISA</b>	Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia
<b>CECT</b>	<i>Colección Española de Cultivos Tipo</i>
<b>CFA</b>	<i>Colonisation factor antigen</i> (antigénio de fator de colonização)
<b>cGMP</b>	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (guanosina monofostato cíclica)
<b>CHO</b>	Células de ovário de hamster chinês
<b>CT</b>	<i>Cholera enterotoxin</i> (enterotoxina da cólera)
<b>CTFR</b>	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (regulador de condutância transmembranar em fibrose cística)

<b>CT-SMAC</b>	<i>MacConkey Sorbitol Agar</i>
<b>daaE</b>	Gene que codifica a fímbria F1845
<b>DAEC</b>	<i>Diffusely Adherent E. coli</i> ( <i>E. coli</i> de aderência difusa)
<b>DAF</b>	<i>Decay accelerating factor</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6'-diamidino-2-fenilindol</i>
<b>DEC</b>	<i>Diarrhoeagenic Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> diarreiogénica)
<b>D-MEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl Sulfoxide Solution</i> (solução de dimetilsulfóxido)
<b>dNTPs</b>	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> (desoxirribonucleósidos trifosfatos)
<b>eae</b>	Gene que codifica a proteína intimina
<b>EAEC</b>	<i>Enteropathogenic E. coli</i> ( <i>E. coli</i> enteropatógena)
<b>EAF</b>	<i>EPEC adherence factor</i> (fator de aderência das estirpes EPEC)
<b>EAST1</b>	<i>Enteropathogenic heat-stable toxin 1</i> (toxina enteropatógena termoestável 1)
<b>ECACC</b>	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>EGTA</b>	<i>Ethylene Glycol-bis (2-aminoethylether) –N, N, N', N'– Tetraacetic Acid</i>
<b>EHEC</b>	<i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> ( <i>E. coli</i> enterohemorrágica)
<b>EIEC</b>	<i>Enteroinvasive E. coli</i> ( <i>E. coli</i> enteroinvasiva)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunoassays</i>
<b>EPEC</b>	<i>Enteropathogenic E. coli</i> ( <i>E. coli</i> enteropatógena)
<b>EspS</b>	<i>EPEC secreted proteins</i> (proteínas secretadas das estirpes EPEC)
<b>ETEC</b>	<i>Enterotoxigenic E. coli</i> ( <i>E. coli</i> enterotoxinogénica)
<b>ExPEC</b>	<i>Extracellular Pathogenic E. coli</i> ( <i>E. coli</i> patogénica extracelular)
<b>F1845</b>	Adesina fimbrial 1845
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
<b>Gb3</b>	Globotriaosilceramida

<b>Gb4</b>	Globotetraosilceramida
<b>GC – C</b>	Guanilato ciclase
<b>GM1</b>	<i>Monosialotetrahexosylganglioside</i> (monossialogangliósidos)
<b>HC</b>	<i>Hemorrhagic Colitis</i> (colites hemorrágicas)
<b>HEp-2</b>	Células do epitélio da laringe humana
<b><i>hlyA</i></b>	Gene que codifica a enterohemolisina
<b>HSD</b>	<i>Honestly Significant Difference</i> (diferença honestamente significativa)
<b>HSV-1</b>	<i>Herpes Simplex Virus 1</i> (herpes simplex vírus 1)
<b>HT-29</b>	Células de carcinoma do cólon humano
<b>HUS</b>	<i>Hemolytic-Uremic Syndrome</i> (síndrome hemolítica-urémica)
<b><i>ial</i></b>	<i>Invasion associated locus</i> (locus associado à invasão)
<b>IMViC</b>	Conjunto de testes bioquímicos (indol, vermelho de metilo, <i>Voges-Proskauer</i> e citrato)
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
<b>Int-407</b>	Células do jejuno humano
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol Trifosfato
<b>ISA</b>	Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa
<b>kb</b>	kilo pares de bases
<b>LDH</b>	<i>Lactate Dehydrogenase</i> (lactato desidrogenase)
<b>LEE</b>	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
<b>LPS</b>	Lipopolissacárido
<b>LT</b>	<i>Heat-labile toxin</i> (toxina termo-lábil)
<b>MNEC</b>	<i>Meningitis-associated E. coli</i> ( <i>E. coli</i> associada a meningites)
<b>MRVP</b>	<i>Methyl Red, Voges – Proskauer</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>pAA</b>	Plasmídeo de aderência agregativa
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (tampão fosfato)



<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
<b>plnv</b>	Plasmídeo responsável pela invasão de EIEC
<b>RT</b>	<i>Reverse Transcriptase</i> (enzima transcriptase reversa)
<b>RTE</b>	<i>Ready-To-Eat (food)</i> ((alimentos) prontos-a-comer)
<b>RT-PCR</b>	Real Time PCR
<b>RTX</b>	<i>Repeats in toxin</i>
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SSC</b>	<i>Sodium Saline Choride Citrate Buffer</i> (Tampão de citrato de sódio salino)
<b>ST</b>	<i>Heat-stable toxin</i> (toxina termo-estável)
<b>STEC</b>	<i>Shigella Toxin E. coli</i> ( <i>E. coli</i> produtora da toxina de <i>Shigella</i> )
<b>Stx</b>	<i>Shiga-like toxin</i>
<b>stx</b>	Gene que codifica a toxina Stx (VT)
<b>Taq</b>	<i>Thermus Aquaticus Thermostable DNA polymerase</i> (Polimerase de DNA termorresistente)
<b>TBE</b>	Tampão Tris-Borato-EDTA
<b>TBX</b>	<i>Tryptone Bile X-Glucuronide</i>
<b>Tir</b>	<i>Translocated intimin receptor</i> (recetor translocado para a intimina)
<b>TPP</b>	<i>Thrombotic Thrombocytopenic Purpura</i> (púrpura trombocitopénica)
<b>TSA-YE</b>	<i>Tryptone Soya Agar with Yeast Extract</i>
<b>TSB</b>	<i>Tryptone Soya Broth</i>
<b>TTSS</b>	<i>Type III secretion system</i> (sistema de secreção do tipo III)
<b>U</b>	Unidade de atividade enzimática
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colónias
<b>UPEC</b>	<i>Uropathogenic E. coli</i> ( <i>E. coli</i> uropatogénica)
<b>UTIs</b>	<i>Urinary tract infections</i> (infecções do trato urinário)
<b>VERO</b>	Células dos rins de macaco verde africano
<b>VT</b>	Verotoxina (Stx)
<b>VTEC</b>	<i>Verotoxinogenic E. coli</i> ( <i>E. coli</i> verotoxinogénica)

## 1. Introdução

### 1.1. Caracterização de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez pelo pediatra alemão Theodor Escherich, em 1885, que demonstrou a sua presença como hóspede natural do tubo digestivo das crianças e, devido a isso, foi inicialmente identificada por *Bacterium coli commune*. Posteriormente, em 1919, Castelani e Chalmers designaram esta bactéria por *Escherichia coli* em homenagem a Escherich (Chen e Frankel, 2005). Sendo um microrganismo competidor faz parte do grupo de anaeróbios facultativos mais abundantes da microbiota intestinal animal, colonizando o trato gastrointestinal humano logo após o nascimento. Estabelecendo com o hospedeiro uma relação de benefício mútuo, estas *E. coli* comensais, raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais são danificadas (Drasar e Hill, 1974; Sweeney *et al.*, 1996; Nataro e Kaper, 1998).

No que respeita à taxonomia, *E. coli*, pertence ao Reino Bacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Enterobacteriales; Família Enterobacteriaceae; Género *Escherichia*; Espécie *E. coli*. O género *Escherichia*, para além da espécie *E. coli*, compreende as espécies *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* e *E. blattae* (Ferreira e Sousa, 2000; Madigan e Martinko, 2006).

É uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, não esporulada, com forma de bastonetes de extremidades arredondadas (com cerca de 1,1 – 1,5 µm de diâmetro e 2 a 6 µm de comprimento). É b-D-glucuronidase positiva (fermentam a lactose), fermentadora da glucose, produtora de catalase e citocromo c-oxidase negativa. Pode ser móvel, contendo múltiplos flagelos peritriquiais (Lacasse, 1995; Ferreira e Sousa, 2000; Madigan e Martinko, 2006), ou imóvel.

A patogenicidade de certas estirpes de *E. coli* deve-se a clones que adquiriram atributos de virulência específicos, o que lhes confere a capacidade de se adaptarem a outros nichos e provocarem um amplo espectro de doenças. Esses atributos de virulência são frequentemente codificados em elementos genéticos que podem ser mobilizados em diferentes estirpes, criando novos fatores de virulência, ou em elementos genéticos que evoluíram e se inseriram no genoma. Apenas certas combinações de fatores de virulência têm persistido até se tornarem patótipos de *E. coli*, capazes de provocar doenças em indivíduos saudáveis (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Os vários patótipos de *E. coli* tendem a ser grupos clonais, caracterizados pelos antígenos somáticos da parede O (lipopolissacarídeo, LPS), flagelares H e capsulares K, que definem

os serogrupos (apenas o antígeno O) e os serótipos (todos os antígenos), classificados pela sequência O:K:H, estabelecida em 1947 por Kauffmann (Edwards e Ewing, 1972; Lior, 1994; Nataro *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2004). Atualmente, existem mais de 173 antígenos O diferentes e cada um deles define um serogrupo, mais de 100 antígenos K e cerca de 60 H, estando apenas uma parte destes antígenos relacionada com doenças em humanos (Wang *et al.*, 2007).

O crescimento de uma população microbiana colocada em condições favoráveis é, geralmente, exponencial. Isto explica a deterioração muito rápida de alguns géneros alimentícios, como o leite ou o peixe. O tempo de geração de *E. coli* em condições ótimas é cerca de 17 minutos (Lacasse, 1995). Esta bactéria é, de um modo geral, de crescimento fácil em meios de cultura líquidos e sólidos. Com requerimentos nutricionais muito simples, são capazes de crescer numa grande variedade de fontes de carbono e energia como: açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, entre outros (Madigan e Martinko, 2006). A glucose é o substrato mais utilizado devido sua facilidade de ser metabolizada. As colónias típicas de *E. coli* apresentam-se homogéneas, brancas (por vezes acinzentadas ou com pigmentos amarelos), opacas (por vezes com superfície brilhante) e lisas mas ligeiramente convexas, após 24 – 48 horas em agar nutritivo.

*E. coli* é uma bactéria mesófila típica, com crescimento ótimo a temperaturas entre os 30 a 37 °C, não crescendo normalmente a temperaturas inferiores a 8-10 °C ou superiores a 44-45 °C (Buchanan e Doyle, 1997; CAC, 2003). Contudo, o facto de o seu crescimento ser inibido não põe em causa a sua sobrevivência e existem, por exemplo, estirpes que são capazes de sobreviver a temperaturas de 4 °C (estirpes resistentes à refrigeração) e/ou temperaturas de congelação, por períodos extensos (Anang *et al.*, 2007). Consideremos os estudos efetuados por Padhye e Doyle (1992) que mostram que este microrganismo pode sobreviver em carne moída congelada a – 80 °C e conservada a – 20 °C, por mais de nove meses. Estas bactérias são, normalmente, destruídas a 60 °C durante 30 minutos, no entanto estirpes termo-resistentes podem sobreviver a esta exposição. Por conseguirem sobreviver numa ampla gama de temperaturas, apresentam um elevado risco para a Indústria Alimentar.

O valor de pH ótimo para o crescimento desta bactéria é neutro, crescendo entre valores de 5,6 e 6,8. No entanto algumas estirpes, como por exemplo a O157:H7 ou a O26:H11, apresentam uma elevada resistência ao ácido (Goodson e Rowbury, 1989; Conner e Kotrola, 1995; Lin *et al.*, 1996; Presser *et al.*, 1997). Isto leva a que a presença de *E. coli* em valores baixos de pH ( $\leq 4,5$ ), associada a alimentos como a maionese, vinagre de cidra e produtos à base de leite fermentado ou carne fermentada, venha sendo reportada (Miller e Kaspar, 1994; Zhao e Doyle, 1994; Rocelle *et al.*, 1996). Esta resistência ao ácido pode

explicar, de certa forma, a capacidade que certas estirpes apresentam para sobreviver à passagem pelo estômago e causar infecções em doses baixas (CAC, 2003).

O mínimo de  $a_w$  exigido para a sua multiplicação é cerca de 0,95 e não sobrevive, normalmente, a valores inferiores (Rocelle *et al.*, 1996). No entanto o serótipo O157:H7 pode, segundo Ryu *et al.* (1999), sobreviver até oito semanas em  $a_w$  de 0,34. Segundo Glass *et al.* (1992), certas estirpes que se mostram tolerantes à acidez são também capazes de sobreviver a tratamentos de secagem. O crescimento ou a ausência de crescimento de *E. coli* em resposta a combinações de temperatura e  $a_w$  é particularmente importante no processamento da carne, onde *E. coli* é usada como indicador de contaminação fecal (Salter *et al.*, 2000).

Além disto, apresenta uma elevada tolerância ao sal. Segundo os estudos realizados por Salter *et al.* (2000) a maior tolerância ao NaCl é observada em condições de temperatura ótima de crescimento.

Tal como todas as enterobactérias, *E. coli* tem uma distribuição ubiquitária, encontrando-se, para além dos animais de sangue quente, também nos solos, plantas e águas (Ferreira e Sousa, 2000) e possui a capacidade de formar biofilmes<sup>1</sup> em várias superfícies (Moreira *et al.*, 2006; Reisner *et al.*, 2006; Weiss-Muszkat *et al.*, 2010).

### 1.2. Patótipos, principais fatores de virulência e patogénese

Os patótipos de *E. coli* usam um sistema geral de patogénese semelhante ao usado por outros agentes patogénicos e que consiste na colonização de um local da mucosa, evasão das defesas do hospedeiro, multiplicação e iniciação de danos celulares (Nataro e Kaper, 1998). Estas estirpes possuem a capacidade de colonizar a superfície da mucosa intestinal apesar da competição por nutrientes com a microbiota comensal do intestino (incluindo *E. coli* comensal) e possuem fatores de aderência específicos, o que lhes permite colonizar sítios onde normalmente não habitam, tais como o intestino delgado (Levine *et al.*, 1984).

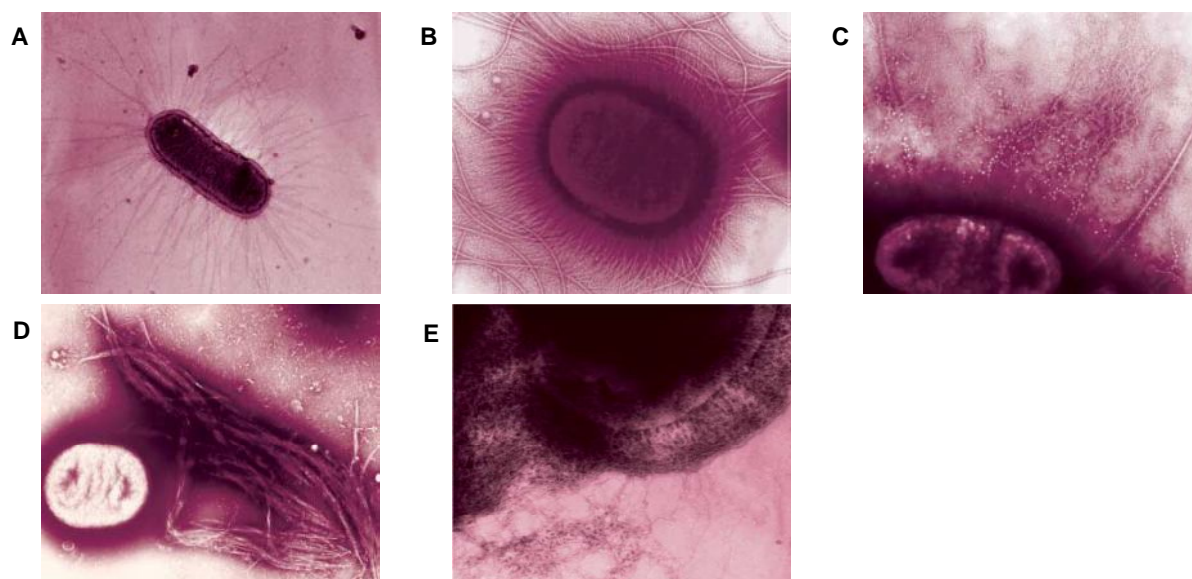
As estirpes de *E. coli* diarreiogénicas (DEC) encontram-se divididas em seis categorias principais: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro e Kaper, 1998), que são diferenciadas com base na sua patogénese, manifestações clínicas e presença de fatores de virulência específicos.

---

<sup>1</sup>Comunidade microbiana séssil caracterizada por células irreversivelmente aderentes a um substrato ou entre elas, embebidas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares por elas produzidas e que apresentam alterações fenotípicas, no que respeita a taxas de crescimento e expressão génica (Donlan e Costerton, 2002).

A versalidade do genoma destas categorias é conferida principalmente pela existência de ilhas de patogenicidade cromossômicas ou plasmídicas. A patogenicidade destas estirpes deve-se assim a genes presentes nestas regiões que codificam vários fatores de virulência, tais como: fímbrias, sistemas de secreção e/ou toxinas (Wood *et al.*, 1986; Nataro *et al.*, 1987; Hales *et al.*, 1992).

A aderência de *E. coli* às células hospedeiras é viabilizada pelos antígenos do fator de colonização (CFA), também designados por antígenos de aderência ou adesinas, sintetizados pelas bactérias e que desempenham um papel muito importante na aderência bacteriana às superfícies das mucosas. As adesinas compreendem diferentes estruturas morfológicas filamentosas, denominadas fímbrias e/ou, mais raramente, fibrilas. Estas estruturas são semelhantes a cabelos, bastante mais finas que os flagelos e encontram-se em toda a superfície das bactérias (Figura 1). As fímbrias estão presentes em muitas bactérias Gram negativas e assemelham-se a uma haste reta (apêndices finos), com diâmetros de 5-10 nm. Já as fibrilas apresentam 2-4 nm de diâmetro e são longas e duras ou enroladas e flexíveis (Cassels e Wolf, 1995).

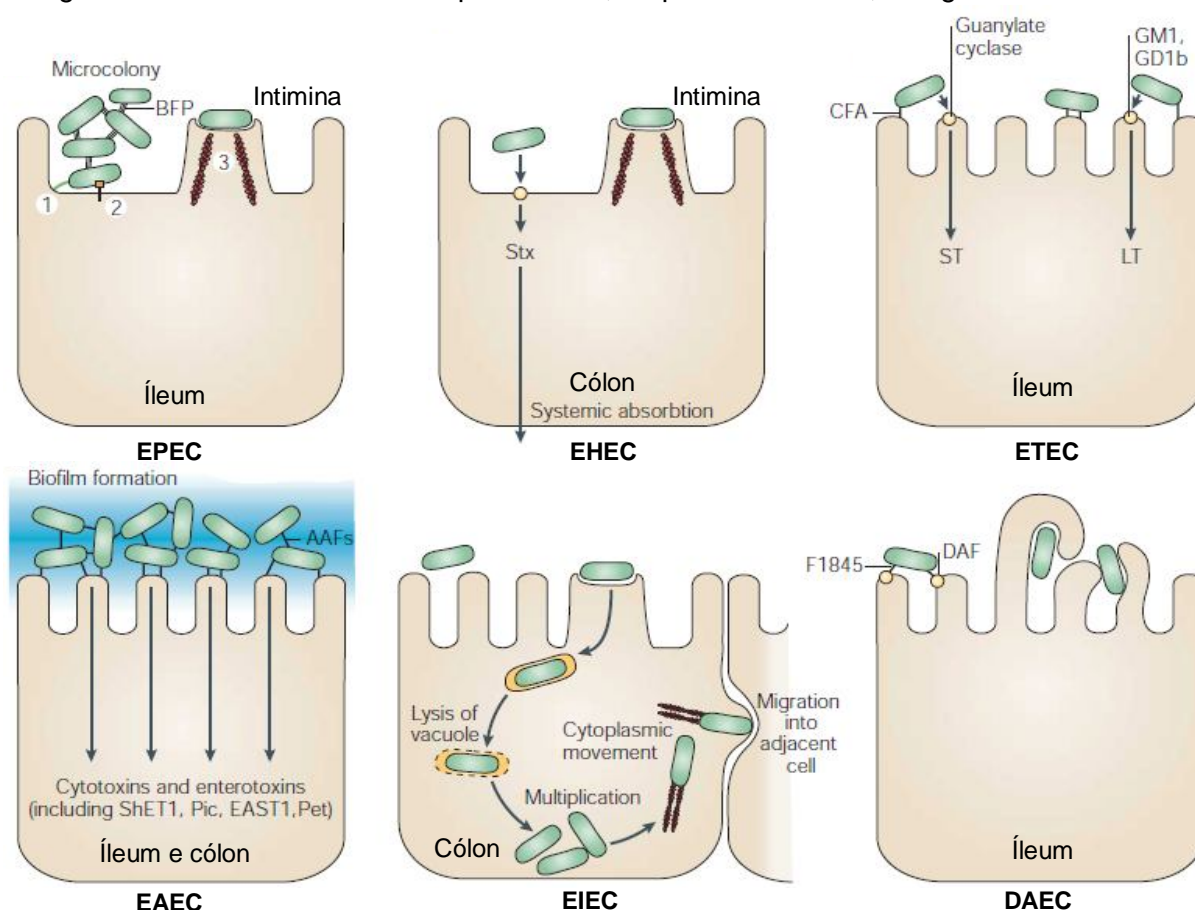


**Figura 1 – Antígenos do fator de colonização (CFA) de *E. coli*: fímbrias e/ou fibrilas.**

**A:** Fímbrias tipo III, presentes em estirpes ETEC. Fímbrias longas, com 5-7 nm de diâmetro, dispostas em linha reta e uniformemente distribuídas sobre toda a superfície da célula. **B:** Fímbrias do tipo I, que podem também ser encontradas em ETEC e que contrastam com espessos flagelos, de maior dimensão. Fímbrias abundantes, longas e retas, com 5-7 nm de diâmetro, dispostas de forma homogênea sobre a superfície da célula. **C:** Resistentes estruturas fibrilares CS3, finas (2-3 nm de diâmetro) e flexíveis. Produzidas por ETEC, estendem-se a vários micrómetros da superfície da célula. **D:** *Bundle-forming pilus* (BFP), fímbrias do tipo IV, presentes em EPEC. Agregados laterais formando grandes estruturas semelhantes a uma corda (> 10 nm de comprimento), de largura variável. **E:** Fibrilas finas (2-5 nm de diâmetro), enroladas e altamente agregativas, produzidas por uma grande variedade de estirpes de *E. coli* patogénica e não patogénica (Adaptado de Kaper *et al.*, 2004).

A presença de fímbrias de aderência superficial é uma propriedade que praticamente todas as estirpes de *E. coli* têm, mesmo as não patogênicas, no entanto, os patótipos apresentam antigénios de aderência do tipo fímbria específicos, que melhoram a sua colonização intestinal ao aumentarem a capacidade de aderência à mucosa (Levine *et al.*, 1984) e permitirem a colonização de locais que normalmente estes microrganismos não colonizariam (Nagy e Fekete, 1999). Os genes que codificam estas fímbrias são de origem plasmídica (Ferreira e Sousa, 2000). As estirpes de *E. coli* patogênicas têm também adesinas não fimbriais (AfaE), compostas por proteínas ou polissacarídeos não filamentosos, tais como a intimina (descrita no ponto 1.2.1, na caracterização das estirpes EPEC), que participam na ligação das bactérias às células do hospedeiro (Tieng *et al.*, 2002).

As categorias de DEC, mencionadas anteriormente, apresentam características únicas no que respeita à interação que estabelecem com as células eucarióticas. A interação de cada categoria com a célula-alvo está representada, esquematicamente, na figura 2.



**Figura 2 – Esquema representativo das categorias DEC: EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC e DAEC.**

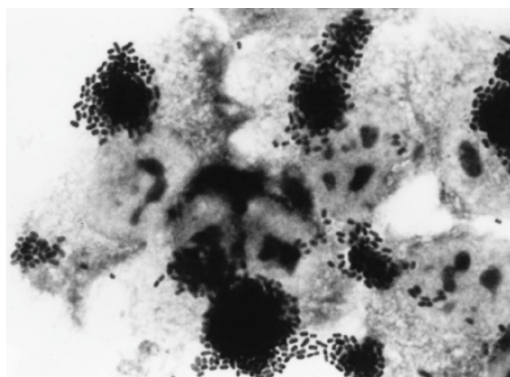
AAFs – Fímbrias de aderência agregativa; BFP – *bundle-forming pilus*; CFA – Antigénio do factor de colonização; DAF – *Decay accelerating factor*; EAST1 – Toxina enteroagregativa termo-estável; LT – Enterotoxina termo-lábil; ShET1 – Enterotoxina *Shigella* 1; ST – Enterotoxina termo-estável; **1** – Aderência localizada (AL); **2** – Translocação de proteínas através do sistema de secreção tipo III; **3** – Formação de pedestal (Adaptado de Sansonetti, 1992; Nataro *et al.*, 1998 e Kaper *et al.*, 2004).

Este trabalho centrou-se nos patótipos de *E. coli* de origem intestinal por serem os que estão diretamente relacionados com as contaminações alimentares, contudo deve ter-se em consideração que existem patótipos de *E. coli* responsáveis por infeções extra-intestinais (ExPEC). As categorias principais de ExPEC são: *E. coli* uropatogénica (UPEC) e o grupo de *E. coli* associado a meningites (MNEC). As UTIs são as infeções extra-intestinais mais comuns e são causadas por UPEC, já o grupo MNEC é responsável principalmente, tal como o nome indica, por meningite e septicemia (Russo e Johnson, 2000).

Deve ser também considerado, pela pecuária e indústria de transformação de carnes, que as estirpes de *E. coli* diarreiogénicas também podem causar doenças em animais usando não só muitos dos mesmos fatores de virulência que estão presentes em estirpes humanas como fatores de colonização únicos que não são encontrados em humanos. E que ainda é possível encontrar patótipos que apenas se tornam patogénicos em animais, por exemplo, *E. coli* patogénica aviária (APEC), que causa infeções extra-intestinais, principalmente infeções respiratórias, pericardite e septicemia em aves de capoeira (Kaper *et al.*, 2004).

### 1.2.1. EPEC: *E. coli* enteropatogénica

As bactérias EPEC aderem inicialmente à superfície do epitélio intestinal na forma de microcolónias localizadas (AL) (Figura 3) e, posteriormente, causam uma lesão típica nas células intestinais, denominada *attaching and effacing lesion* (A/E) (McDaniel *et al.*, 1995; Kaper *et al.*, 2004; Tsalie *et al.*, 2006).



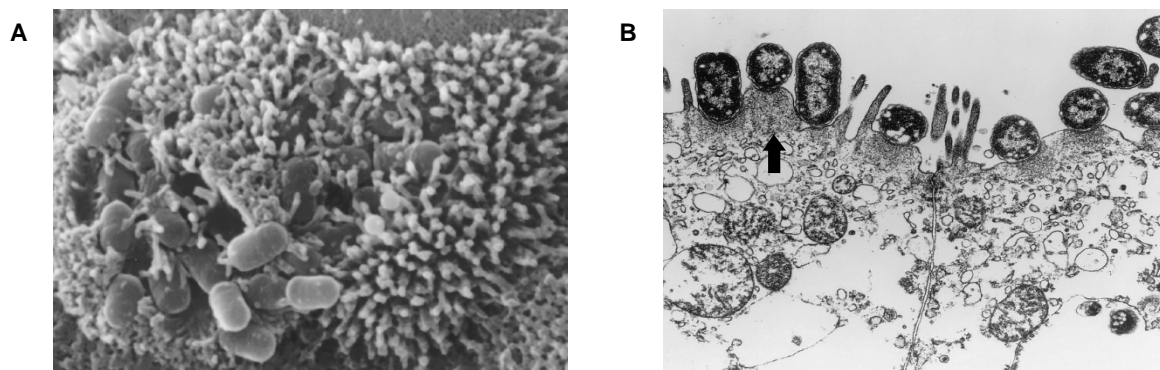
**Figura 3 – Aderência localizada (AL) de EPEC às células hospedeiras, na linha celular HEp-2.**

As bactérias formam microcolónias características e localizadas na superfície das células. Esta fase traduz a especificidade das bactérias para as células-alvo (Adaptado de Nataro e Kaper, 1998).

A lesão A/E (Figura 4) caracteriza-se por uma aderência íntima da bactéria aos enterócitos, destruição da estrutura das microvilosidades e indução de alterações no citoesqueleto, incluindo o acúmulo de actina polimerizada e formação de estruturas semelhantes a um



pedestal, por baixo das bactérias aderentes (McDaniel *et al.*, 1995; Kaper *et al.*, 2004; Donnenberg e Whittam, 2001; Tsalie *et al.*, 2006).



**Figura 4 – Aderência íntima (AI) e lesão A/E observada no intestino delgado após inoculação oral de estirpes EPEC em leitões de laboratório.**

**A** – Aderência íntima de EPEC ao epitélio, causando a lesão A/E, após oito horas de infecção, *in vitro*. (Frankel *et al.*, 2001). **B** – Pode ser observada a aderência íntima da bactéria à membrana do enterócito, com rutura da superfície apical do citoesqueleto e formação do pedestal na membrana celular (a seta a negro representa um dos pedestais que podem ser observados na figura) (Nataro e Kaper, 1998).

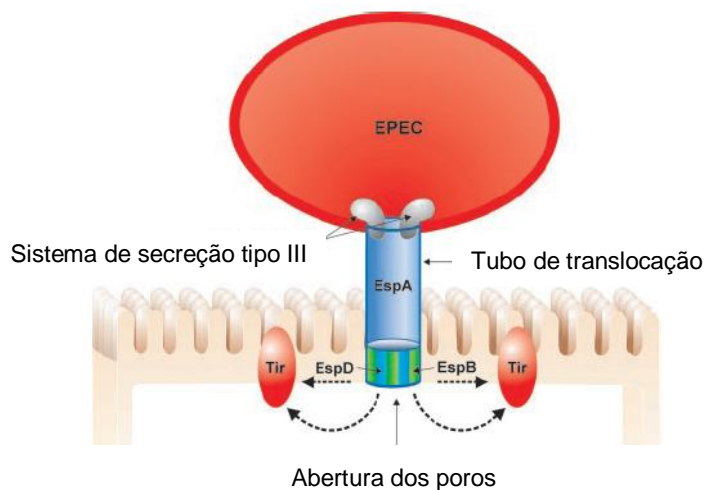
Estudos, *in vitro*, revelam que o modelo de patogénese da bactéria ocorre em três fases principais (Figura 2), contudo a sua sequência temporal não é certa, podendo as diferentes etapas ocorrer simultaneamente.

**1ª Fase – Aderência localizada (AL):** Ocorre a aderência localizada entre as bactérias e as células da membrana citoplasmática do enterócito. O contacto inicial entre as EPEC e a célula hospedeira é mediado por fímbrias do tipo IV, expressas na superfície da bactéria, denominadas *bundle-forming pilus* (BFP) (Figura 1-D), sendo estas as responsáveis por este tipo de aderência (AL). As BFP são também responsáveis pela interconexão das microcolónias, o que lhes confere estabilidade (Girón *et al.*, 1993; Nataro e Kaper, 1998; Ferreira e Sousa, 2000; Donnenberg e Whittam, 2001). Estas adesinas são codificadas por genes que se encontram num plasmídeo de 70-100 kb, designado por EAF (*EPEC adherence factor*) (Baldini *et al.*, 1983; Girón *et al.*, 1991; Tobe *et al.*, 1999; Garmendia *et al.*, 2005). Estudos mostram que o plasmídeo EAF não é essencial para a formação da lesão A/E, mas que a sua presença aumenta a eficiência destas lesões (Nataro e Kaper, 1998). Este facto deve-se, provavelmente, à presença ou ausência de BFP, na aderência das bactérias ao epitélio intestinal (Frankel *et al.*, 1998).

**2ª Fase – Transdução de sinal:** Os genes bacterianos responsáveis pela atividade de transdução de sinal são codificados numa ilha de patogenicidade de 35 kb, denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE) (McDaniel *et al.*, 1995; Kenny, *et al.*, 1997; Goosney *et al.*, 2000). LEE é considerada uma ilha de patogenicidade porque contém vários genes



associados com virulência e não é encontrada em estirpes de *E. coli* comensais (Donnenberg e Whittam, 2001). Estes genes codificam um sistema de secreção do tipo III (TTSS), promovendo a transferência de moléculas bacterianas efetoras para a célula recetora. Várias proteínas são secretadas, entre as quais a proteína efetora Tir (*translocated intimin receptor*), que é codificada pelo gene *tir*, translocada para as células epiteliais e integrada na membrana da célula hospedeira, onde funciona como um recetor para a intimina (Kenny *et al.*, 1997; Frankel *et al.*, 1998; Nataro e Kaper, 1998; Tsalie *et al.*, 2006), igualmente secretada por estas bactérias. São também secretadas proteínas translocadoras da família Esps (EPEC – *secreted proteins*), incluindo a EspA, B e D e proteínas efetoras EspF, EspG e Map, codificadas pelos genes *esc* e *sep* (presentes na LEE), que são essenciais na patogénese de EPEC. Embora cada uma apresente uma função específica, as primeiras estão relacionadas com a formação do sistema de translocação que coloca as moléculas efetoras, entre as quais o Tir, dentro das células hospedeiras (Figura 5) e as segundas são responsáveis por distúrbios no citoesqueleto, interferindo com as funções celulares (Nataro e Kaper, 1998; Frankel *et al.*, 1998; Crane *et al.*, 2001; Vallance e Finlay, 2000; Kaper *et al.*, 2004).



**Figura 5 - Translocação das Esps (EPEC - *secreted proteins*) através do sistema de secreção tipo III.**

EspA forma um tubo filamentoso de translocação por onde EspB e EspD são inseridos na membrana da célula hospedeira, formando uma estrutura porosa que permite a passagem de outras proteínas efetoras, como o Tir, para o interior das membranas celulares (Vallance e Finlay, 2000).

**3ª Fase – Aderência íntima (AI):** A aderência íntima de EPEC às células epiteliais é mediada por uma proteína de membrana externa de 94 a 97 kDa, designada intimina. A intimina, responsável pela lesão A/E (Figura 4), é codificada pelo gene cromossómico *eae*, presente na ilha de patogenicidade LEE. O gene *eae* é ainda responsável por induzir as atividades de transdução de sinal descritas acima (Nataro e Kaper, 1998). A interação da intimina com o seu recetor Tir permite a penetração e a aderência prolongada de EPEC na

superfície da célula hospedeira, inicia os processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto (McDaniel *et al.*, 1995; Goosney *et al.*, 2000; Ferreira e Sousa, 2000). Existem também proteínas eucarióticas, que funcionam como recetores para a intimina, uma vez que EPEC pode perturbar a polaridade da célula hospedeira, fazendo com que as proteínas da membrana basolateral, em particular as b-integrinas, migrem para superfície celular, onde se podem ligar à intimina, contudo com menos expressão que Tir. A nucleação de filamentos de actina, provocada pela ação de Tir diretamente por baixo das bactérias aderentes, forma uma estrutura complexa designada pedestal (Figura 4), que exerce um papel efetivo na aderência da bactéria (McDaniel *et al.*, 1995; Goosney *et al.*, 2000; Ferreira e Sousa, 2000; Muza-Moons *et al.*, 2003; Tsalie *et al.*, 2006). Outras proteínas do citoesqueleto, tais como a vinculina, cortactina, talina e a-actinina, também se acumulam sob o local onde a bactéria está ligada e são recrutadas para a formação do pedestal. Estas estruturas de pedestal podem-se estender até 10 nm a partir da superfície das células epiteliais (Vallance e Finlay, 2000). A diarreia é provavelmente resultante destes múltiplos mecanismos, incluindo uma secreção ativa de iões, aumento da permeabilidade intestinal, inflamação e perda de superfície de absorção resultante da destruição das microvilosidades (Kaper *et al.*, 2004).

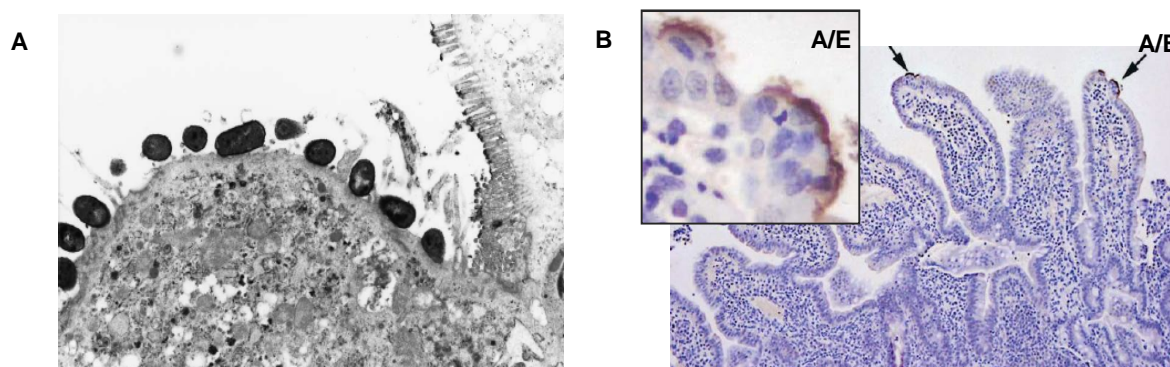
Outros fatores de virulência, codificados fora da LEE, também têm sido descritos. Por exemplo, a proteína LifA (*lymphostatin*) codificada pelo gene *lifA*, com dimensão aproximada de 385 kDA, cuja ação bloqueia a expressão das citocinas e inibe a ativação dos linfócitos (Klapproth *et al.*, 1996; Malstrom e James, 1998; Klapproth *et al.*, 2000). Esta proteína, também presente nas estirpes EHEC, onde é conhecida por Efa1, mostra-se igualmente importante na aderência (Nicholls *et al.*, 2000). Algumas estirpes EPEC podem produzir a endotoxina EAST1, produzida maioritariamente por estirpes EAEC, embora isto não seja muito comum (Savarino *et al.*, 1996).

Os serogrupos mais importantes relacionados com estirpes EPEC são: O55, O86, O111, O114, O119, O127, O142 (típicas) e O26, O55, O86, O11, O125, O128 (atípicas) (Trabulsi *et al.*, 2002).

Estirpes EPEC atípicas contêm a LEE mas não apresentam o plasmídeo EAF. Nos países industrializados EPEC atípica aparece mais frequentemente isolada em casos de diarreia do que EPEC típica, contudo EPEC típica domina em países em desenvolvimento (Trabulsi *et al.*, 2002).

### 1.2.2. EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

Apresentam mecanismos de aderência às células hospedeiras semelhantes às EPEC e a mesma característica de *attaching and effacing lesion* (A/E) (Figura 6), codificada pelo mesmo gene (*eae*), presente em LEE (Jerse *et al.*, 1990; McDaniel *et al.*, 1995). A LEE encontrada nas estirpes EHEC apresenta 93,9 % de homologia na sequência de nucleotídeos com a que está presente em EPEC e o gene *eae* destes dois patótipos apresentam 87,2 % de identidade (Frankel *et al.*, 1998). O sistema de secreção do tipo III (TTSS) e as proteínas efetoras são também homólogos aos modelos EPEC (Jerse *et al.*, 1990; Wales *et al.*, 2005).



**Figura 6 – Aderência íntima e Lesão A/E provocada pela estirpe O157:H7 (EHEC) inoculada no íleum de cabras em laboratório.**

**A** – A bactéria está intimamente aderida à superfície do enterócito. É possível observar a destruição das microvilosidades. **B** – As setas indicam a presença de lesões A/E nos enterócitos (de pequena a média dimensão) (Wales *et al.*, 2005).

Os fatores que as distinguem das EPEC são o facto de agirem sobre o cólon intestinal, em vez do íleum, e a elaboração da *Shiga toxin* (Stx), também designada por verotoxina (VT), codificada num bacteriófago inserido no cromossoma e cuja absorção sistémica coloca em risco a vida do hospedeiro (Reid *et al.*, 2000; Karper *et al.*, 2004) (ver 1.2.7 - B). Estirpes EHEC podem também produzir a enterotoxina EAST1. Outro fator de virulência que está associado as estirpes EHEC é a presença do gene *ehxA*, presente no plasmídeo pO157 (nos serótipos O157), que codifica uma exotoxina designada por enterohemolisina (*hlyA*) (Schmidt *et al.*, 1994). Esta toxina pertence à família das RTX (*repeats in toxin*) e tem sido associada às doenças de maior severidade provocadas por EHEC, uma vez que provoca a lise dos enterócitos, o que leva à libertação de hemoglobina que serve como fonte de ferro e estimula o crescimento do microrganismo (Bauer e Welch, 1996). Nas lesões das mucosas, causadas por EHEC, é observada uma grande concentração de actina polimerizada devido à ocorrência da histopatologia A/E (Knutton *et al.*, 1989) e um aumento na concentração intracelular de IP<sub>3</sub>, o que leva ao aumento dos níveis de cálcio intracelular. No entanto, em

contraste com as estirpes EPEC, as estirpes EHEC não conseguem induzir a fosforilação de proteínas das células epiteliais (Ismaili *et al.*, 1995). Isto mostra que embora o mecanismo de patogênese seja muito semelhante existem algumas diferenças na resposta das células hospedeiras quando infectadas com EPEC ou com EHEC.

Embora muito serótipos de *E. coli* possam produzir VT, a maior parte não contém a ilha de patogenicidade LEE e, devido a isso, geralmente não estão associados a doença humana. Isto levou à utilização dos termos STEC – *Shiga toxin-producing E. coli*, como termo geral que engloba qualquer estirpe produtora de Stx (VT) ou VTEC – *Verotoxin-producing E. coli* para estirpes produtoras de VT e que estão associadas à presença da LEE. O termo EHEC é mais global e compreende as duas categorias. No entanto existem estirpes STEC, LEE-negativas, que estão associados a doenças, como por exemplo a estirpe O103:H21, mas a importância dos fatores de virulência destas estirpes na doença humana ainda não estão bem estabelecidos (Nataro e Kaper, 1988).

As estirpes pertencentes ao serótipo O157:H7 são consideradas os patógenos mais importantes de VTEC. Contudo outros serogrupos, em especial o O8, O26, O45, O55, O103, O111, O113, O118, O121, O128, O145 e O174, também podem causar as mesmas doenças e, por vezes, de forma mais predominante do que o O157:H7 em muitos países, o que leva a uma crescente preocupação sobre a gravidade do seu risco para a saúde humana (Nataro e Kaper, 1988; Montet *et al.*, 2009; Tzschoppe *et al.*, 2012). A sequenciação do genoma de *E. coli* O157:H7 revelou numerosas ilhas de patogenicidade que codificam potenciais fatores de virulência adicionais. Entre estes estão incluídas novas fímbrias e sistemas de absorção e de utilização de ferro (Perna *et al.*, 2001).

### 1.2.3. ETEC: *E. coli* enterotoxinogénica

A colonização intestinal das estirpes ETEC é mediada por várias fímbrias de superfície, de distinta morfologia (Figura 1), entre as quais CFA/I, CFA/II e/ou CFA/IV (Wolf, 1997), que promovem a sua aderência aos enterócitos do intestino delgado por mecanismos semelhantes aos descritos para EPEC e constituem assim o primeiro estágio da infeção entérica nos humanos. A proteína TibA, presente na parte exterior da membrana celular de algumas estirpes ETEC, está associada a uma aderência não fimbrial. Após a sua colonização na superfície da mucosa do intestino delgado ocorre a elaboração e libertação de enterotoxinas termo-lábeis (LT) e/ou termo-estáveis (ST), as quais são responsáveis pela patogênese desta infeção entérica (Levine, 1987; Ferreira e Sousa, 2000; Karper *et al.*, 2004) (Ver 1.2.7 – A). Os genes responsáveis pelos CFA são geralmente codificados em plasmídeos, que tipicamente também codificam as enterotoxinas ST e/ou LT (Graaf e

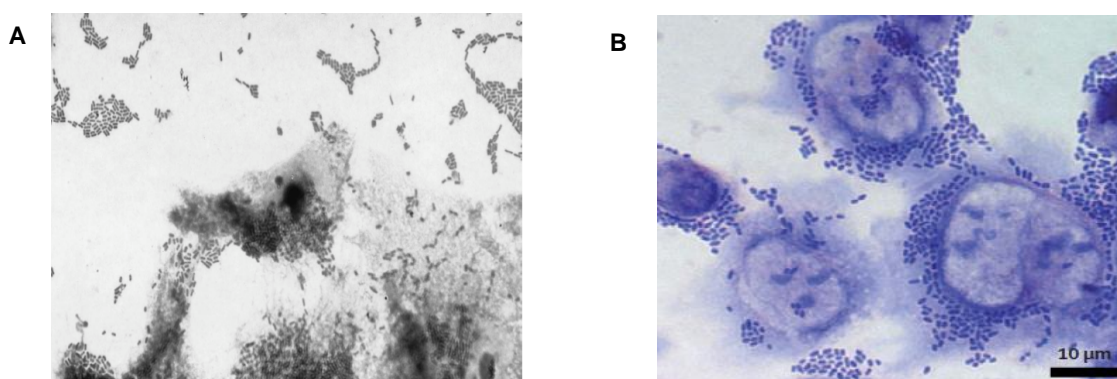
Gaastra, 1994). Além da LT e ST, as toxinas EAST1, EatA e ClyA também podem ser produzidas pelas ETEC (Touner *et al.*, 2006).

As estirpes ETEC estão associadas a um largo número de serogrupos mas o O6, O8, O9, O15, O20, O25, O27, O64, O68, O77, O78, O101, O114, O115, O126, O128, O138, O139, O141, O148, O149 e O157 são aparentemente os mais comuns e encontrados em vários países (Wilson e Francis, 1986; Ojeniyi *et al.*, 1994; Garabal *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1997; Nagy e Fekete, 1999; Francis, 2002).

ETEC são também uma causa importante de diarreia em animais podendo nestes casos, expressar outros fatores de colonização que não foram ainda encontrados em humanos (Karper *et al.*, 2004).

#### 1.2.4. EAEC: *E. coli* enteroagregativa

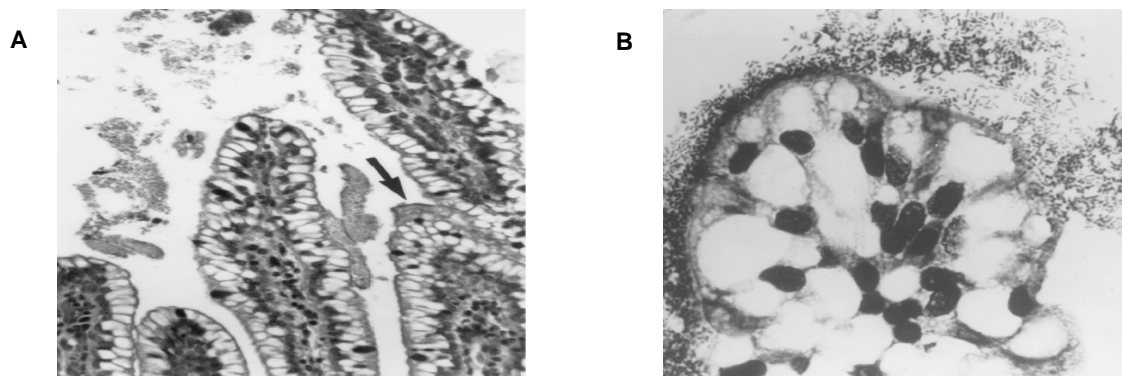
Apresentam um mecanismo de aderência às células epiteliais completamente distinto das EPEC (Scaletsky *et al.*, 1984). As estirpes EAEC, também conhecidas por EAggEC, podem aderir ao epitélio do intestino delgado e grosso, contudo atuam predominantemente sobre o cólon. Estas bactérias têm uma aderência autoagregativa padrão (AA) (Figura 7), em que as bactérias aderem umas às outras numa conformação do tipo *stacked-brick* e provocam a autoaglutinação dos enterócitos (Nataro *et al.*, 1998; Yamamoto e Echeverria, 1996). A estratégia base da infecção de EAEC compreende a colonização inicial da mucosa intestinal por fímbrias de aderência agregativa (AAF), de 2 a 3 nm de diâmetro e de estrutura flexível, codificadas no plasmídeo pAA (Nataro *et al.*, 1992; Czeczulin *et al.*, 1997). Existem, pelo menos, quatro variantes de AAF que podem estar presentes nestas estirpes, CFA/I, CFA/II, CFA/III e CFA/IV, mas nem todas as bactérias aderem por intermédio de AAF (Yamamoto e Echeverria, 1996; Czeczulin *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1998; Karper *et al.*, 2004).



**Figura 7 – Aderência agregativa (AA) que define EAEC.**

As bactérias aderem umas às outras tanto longe das células como na superfície celular, formando uma configuração típica designada por *stacked-brick* (A - Nataro e Kaper, 1998; B – Bielaszewska *et al.*, 2011).

A colonização de EAEC é caracterizada pela capacidade destas estirpes formarem um biofilme espesso (Figura 2) e pela produção de enterotoxinas e citotoxinas secretoras. O biofilme aprisiona as bactérias e estimula a secreção de muco pelas células do epitélio intestinal (Figura 8), o que está, certamente, relacionado com sua capacidade de causar uma colonização persistente (Nataro *et al.*, 1998; Karper *et al.*, 2004).



**Figura 8 – Interação de EAEC com o epitélio intestinal.**

**A** – A seta aponta para a camada de muco espesso aderente à mucosa intestinal. **B** - Ampliação da imagem anterior, note-se os agregados de bactérias revestindo a superfície das vilosidades dos enterócitos, que parecem estar inchados (Nataro e Kaper, 1998).

As lesões provocadas por EAEC manifestam-se pelo encurtamento das microvilosidades, necrose hemorrágica e resposta inflamatória leve com edema. Várias toxinas têm sido descritas para estirpes EAEC mas a sua patogenicidade está diretamente relacionada com a produção da enterotoxina enteroagregativa termoestável, EAST1 (Savarino *et al.*, 1991; Savarino *et al.*, 1993) (ver 1.2.7 – A).

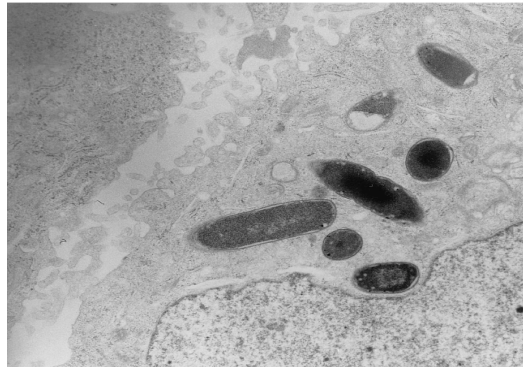
Muitas estirpes EAEC secretam uma toxina autotransportadora designada Pet, codificada por um plasmídeo próximo do gene que codifica a AAF, que tem uma atividade tóxica sobre os enterócitos podendo, também, provocar alterações no citoesqueleto e o arredondamento das células epiteliais (Navarro-Garcia *et al.*, 1998).

### 1.2.5. EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

São bioquimicamente, geneticamente e patogenicamente intimamente relacionadas com *Shigella* spp (Pupo *et al.*, 2000) e, tal como este microrganismo, o local da sua infeção é a mucosa do cólon (Sansonetti, 1992). São capazes de penetrar nas células (Figuras 2 e 9), podendo ser consideradas como um verdadeiro patótipo intracelular, capaz de invadir e se multiplicar no interior das células epiteliais e macrófagos. Após a invasão das células epiteliais do cólon provocam a lise do fagossoma, multiplicam-se intracelularmente e movem-se através das células afetadas por nucleação dos filamentos de actina, de forma a



contaminar as células epiteliais adjacentes (Sansonetti, 1992; Goldberg e Sansonetti, 1993; Sansonetti, 2002).



**Figura 9 – Interação de EIEC com as células epiteliais.**

Como a bactéria *Shigella*, as estirpes EIEC invadem as células epiteliais do intestino, causam a lise do fagossoma e movem-se através do citoplasma, infectando as células adjacentes. Esta figura mostra EIEC no citoplasma de células infectadas (Nataro e Kaper, 1998).

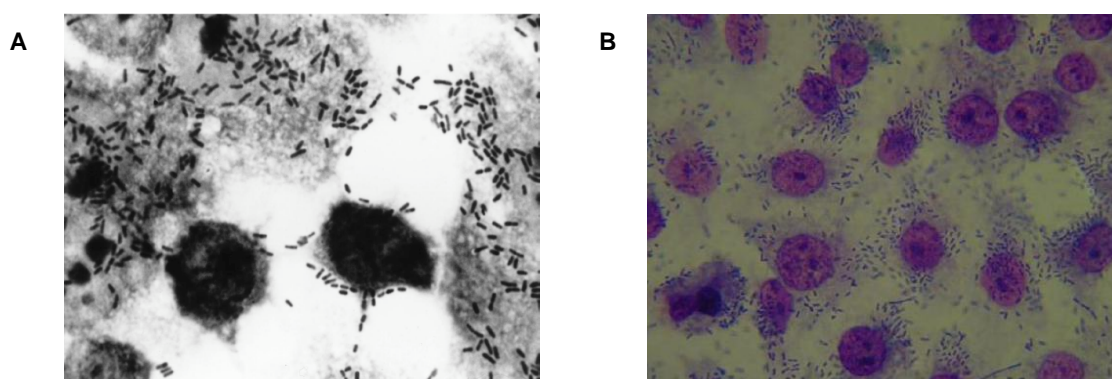
As bactérias podem mover-se lateralmente através do epitélio por propagação direta célula a célula ou podem sair e reentrar na membrana plasmática basolateral (Karper *et al.*, 2004). A sua capacidade de invasão está associada com a presença de um grupo de genes que codificam polipéptidos de superfície bacteriana, tais como o gene *ial* (*invasion associated locus*) e o gene *ipaH* (sendo que o último está também presente no cromossoma bacteriano). Estes genes são codificados num plasmídeo de invasão denominado pL<sub>N</sub>V, de grande dimensão, não só encontrado nas estirpes EIEC como em todas as espécies de *Shigella* (Harris *et al.*, 1982; Buchrieser *et al.*, 2000). Este plasmídeo codifica um sistema de secreção tipo III (Egile *et al.*, 1999) que segrega múltiplas proteínas, tais como a IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, codificadas nos *loci ipa* (*invasion associated plasmid*), que medeiam os processos de sinalização nas células epiteliais, rearranjo do citoesqueleto, absorção celular, lise do fagossoma, entre outras ações (Sansonetti *et al.*, 2000; Kaper *et al.*, 2004). A circulação destas estirpes no interior do citoplasma parece ser mediada pela ação da proteína de superfície VirG (*IcsA*), que é essencial para a nucleação dos filamentos de actina, formando uma cauda que se estende desde um pólo da bactéria e que as move através do citoplasma, geralmente de forma lateral, para as células adjacentes (Sansonetti, 1992; Vasselon *et al.*, 1992; Goldberg *et al.*, 1993; Adam *et al.*, 1995). A sua multiplicação origina a morte celular e perda de camadas de células epiteliais da superfície (Zychlinsky *et al.*, 1992). Embora estas estirpes sejam invasivas, a sua passagem para a submucosa é rara (Nataro e Kaper, 1998). De todas as categorias, apenas EIEC apresentam a capacidade de invadir e multiplicar-se nas células do hospedeiro, enquanto a maioria das outras estirpes patogénicas permanecem extracelulares. Algumas estirpes como as EPEC,

por exemplo, podem ser internalizadas pelas células epiteliais mas em baixos níveis e não parecem multiplicar-se intracelularmente (Karper *et al.*, 2004), e devido a isso não parecem ser especificamente adaptadas para a sobrevivência intracelular.

Os serogrupos mais relacionados com as estirpes EIEC são: O28, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167 e O173 (Nataro e Kaper, 1998; Lan *et al.*, 2004; Nataro *et al.*, 2007).

### 1.2.6. DAEC: *E. coli* de aderência difusa

Apresentam uma aderência difusa (AD) às células epiteliais do intestino, representada na figura 10, na qual as bactérias se distribuem uniformemente sobre toda a superfície celular, ao contrário do que foi observado nas outras categorias.



**Figura 10 – Aderência difusa (DA) que define DAEC, na linha celular HEp-2.**

As bactérias encontram-se dispersas ao longo da superfície celular (A – Nataro e Kaper, 1998; B – Reddy *et al.*, 2007).

Esta aderência está diretamente relacionada com a presença de uma fímbria de superfície, designada por F1845, produzida por aproximadamente 75% das estirpes DAEC, que é codificada pelo gene *daaE* (que pode ser encontrado tanto no cromossoma bacteriano como em plasmídeo). A fímbria F1845, ao ligar-se ao seu recetor DAF (*Decay-acceleration factor*), interfere com o normal funcionamento desta proteína de superfície celular, que normalmente protege as células de danos (Bilge *et al.*, 1989; Bilge *et al.*, 1993; Cookson e Nataro, 1996; Hasan *et al.*, 2002). A ligação da fímbria F1845 ao recetor DAF induz um efeito citopático de transdução de sinal nos enterócitos do intestino delgado, que se manifesta com o crescimento de longas extensões celulares, microvilosidades (*finger-like cellular projections*) em torno das bactérias aderentes (Figuras 2 e 11) (Peiffer *et al.*, 1998; Hasam *et al.*, 2002). Essas projeções que aparentemente incorporam as bactérias fornecem a sua proteção, mas não completam a sua internalização e estas estirpes permanecem extracelulares.





**Figura 11 – Interação de DAEC com as células epiteliais.**

É possível observar a formação de longas microvilosidades nas células-alvo que rodeiam as bactérias causadas pela ação de DAEC (Nataro e Kaper, 1998).

O padrão de aderência difusa também se deve à presença de adesinas não fimbriais como a AfaE-I e AfaE II (Le Bouguenec e Servin, 2006). As estirpes DAEC são capazes de provocar reação inflamatória nas células intestinais através da indução de secreção da citocina IL-8 (capaz de estimular a migração de leucócitos polimorfonucleares) (Betis *et al.*, 2003). No entanto, algumas estirpes DAEC não induzem esta secreção, isto provavelmente deve-se ao facto de que o grupo DAEC ser composto por bactérias heterogêneas que diferem entre si quanto à sua patogenicidade.

### **1.2.7. Toxinas**

#### **A) Enterotoxinas**

As enterotoxinas ETEC são toxinas citotónicas e pertencem a um dos dois grupos: enterotoxinas termo-lábeis (LT) ou enterotoxinas termo-estáveis (ST). As estirpes ETEC podem expressar uma toxina, LT ou ST, ou então ambas (Spangler, 1992). Os genes responsáveis pela produção destas enterotoxinas, *lt* e *st*, respetivamente, são geralmente codificados por plasmídeos. Por vezes, o mesmo plasmídeo codifica para a produção de mais do que uma toxina e de antígenos de fator de colonização (CFAs).

As toxinas LT são uma classe de toxinas oligoméricas que estão intimamente relacionadas, na estrutura e no modo de funcionamento, com a enterotoxina da cólera (TC) que é expressa por *Vibrio cholerae* (Spangler, 1992; Sixma *et al.*, 1993; Wolf, 1997; Hora *et al.*, 2011). A toxina LT, que é predominantemente encontrada em isolados humanos (LT-I; sendo a LT-II encontrada, normalmente, apenas em isolados de origem animal) é secretada para o meio extracelular por um sistema de secreção do tipo II e apresenta aproximadamente 80 % de homologia na sequência de aminoácidos com a TC e, como a TC, é constituída por uma subunidade A, de aproximadamente 28 kDA, e cinco subunidades

B idênticas, de aproximadamente 11,5 kD cada (Streatfield *et al.*, 1992; Wolf, 1997). As subunidades B, dispostas de forma circular, medeiam a ligação da holotoxina aos gangliósidos GM1 e GD1b da superfície celular e a algumas glicoproteínas intestinais e a subunidade A é responsável pela atividade enzimática da toxina (Teneberg *et al.*, 1994; Kaper *et al.*, 2004; Hora *et al.*, 2011). Após a colonização do intestino delgado e da libertação da LT, a toxina liga-se irreversivelmente aos seus recetores e a subunidade A que atua como ADP-ribosil transferase, é internalizada e transfere uma parte do ADP-ribosil, a partir do NAD, para a subunidade- $\alpha$  da proteína G (proteína transmembranar reguladora da membrana basolateral, que regula a atividade da adenilato-ciclase). A permanente ativação da adenilato-ciclase conduz a um aumento intracelular dos níveis de cAMP intracelular (molécula importante na transdução de sinal em eucariotas, conhecida como um mensageiro secundário) no enterócito, por conversão de ATP, o que induz a ativação da proteína cinase, dependente do cAMP. Esta proteína conduz à fosforilação da CTFR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que funciona como um canal de cloro localizado nas membranas das células epiteliais. Como resultado da fosforilação da CFTR aumenta a secreção de cloro e/ou diminui a absorção de cloreto de sódio. Este desequilíbrio causa um distúrbio na permeabilidade da membrana citoplasmática, com perda de água e electrólitos para o lúmen intestinal, o que origina uma diarreia osmótica não hemorrágica (Sears e Kaper, 1996; Ferreira e Sousa, 2000; Tauschek *et al.*, 2002; Hora *et al.*, 2011). São apenas necessários 15 a 60 minutos de tempo de latência até a LT ser transportada para a membrana basolateral e ativar o complexo adenilato-ciclase. LT pode também estimular a síntese de prostaglandina e o sistema nervoso entérico, que regula a motilidade intestinal e a secreção de iões (Sears e Kaper, 1996).

As toxinas ST, das quais se distinguem a STa e STb (Nair e Takeda, 1998), apresentam-se sob a forma de um único péptido de pequenas dimensões, 2000-5000 kDa. Os genes responsáveis por codificar estas toxinas, são encontrados predominantemente em plasmídeos. Somente as toxinas da classe STa têm sido associadas a doença humana. A toxina STa (também designada por ST-I) é produzida não só por ETEC como por outras bactérias gram-negativas, incluindo *Yersinia enterocolitica* e *V. cholerae*. É um péptido com cerca de 2000 kDa e contém 18 ou 19 resíduos de aminoácidos, seis dos quais são cisteínas (Sears e Kaper, 1996). Apresenta cerca de 50 % de identidade proteica com a enterotoxina EAST1 de EAEC, descrita seguidamente, sendo que algumas estirpes ETEC podem também expressar EAST1 além de STa (Yamamoto e Echeverria, 1996; Savarino *et al.*, 1996). Existem duas variantes da enterotoxina STa designadas por STp (ST suína ou STIa) e STh (ST humana ou STIb), após a sua descoberta inicial em estirpes isoladas de suínos ou humanos, respetivamente. Estas variantes são quase idênticas e ambas estão

associadas às estirpes ETEC que causam doença em humanos. O principal recetor para a STa é uma enzima membranar designada guanilato ciclase C (GC-C) (Sauvage *et al.*, 1992; Vaandrager *et al.*, 1994), que está localizada na superfície apical da membrana das células epiteliais intestinais. A ligação da toxina STa com o seu recetor vai estimular a atividade enzimática intracelular, ocorrendo um aumento intracelular de cGMP (Crane *et al.*, 1992; Sears e Kaper, 1996), que atua como segundo mensageiro em muitas células, tal como o AMPc, e que, por sua vez, ativa cinases dependentes de cGMP e/ou dependentes de cAMP (Currie *et al.*, 1992; Sears e Kaper, 1996), que estimulam a ação do canal de cloro CFTR. Tal facto conduz, em ultima análise, à estimulação da secreção de cloro para o lúmen intestinal e/ou a inibição da absorção de cloreto de sódio por parte das células, resultando na secreção de fluído intestinal, causando assim diarreia. Este mecanismo de patogénese é muito semelhante ao mencionado para as enterotoxinas LT, no entanto a STa age muito mais rápido devido à localização do seu recetor. A toxina STb, ao contrário de STa, induz danos histológicos no epitélio intestinal, que consistem na atrofia parcial ou total de vilosidades das células epiteliais. O recetor para STb é ainda desconhecido, embora tenha sido sugerido que a toxina pode ligar-se inespecificamente à membrana plasmática (Chao e Dreyfus, 1997). STb não estimula o aumento intracelular da concentração de cAMP e cGMP, mas induz um aumento nos níveis de cálcio intracelular através de fontes extracelulares (Dreyfus *et al.* 1993). Ao contrário da secreção de cloro, provocada por STa, STb estimula a secreção de bicarbonato pelas células intestinais (Sears e Kaper, 1996). As toxinas STa e STb podem também estimular a síntese de prostaglandina e o sistema nervoso entérico, tal como as toxinas LT.

As enterotoxinas EAST1 são produzidas maioritariamente pelas estirpes EAEC, contudo outras estirpes DEC podem produzi-las, nomeadamente ETEC e EHEC, como já foi referido anteriormente. EAST1 é um péptido de baixa massa molecular de 38 aminoácidos, homóloga de ST, mas que só apresenta quatro resíduos de cisteína, ao contrário dos seis resíduos característicos de ST (Savarino *et al.*, 1993; Yamamoto e Echeverria, 1996; Nataro e Kaper, 1998). Esta toxina é geneticamente e imunologicamente distinta da toxina ST produzida por ETEC (Savarino *et al.*, 1993), mas é de certa maneira similar a STa no mecanismo de ação sobre o hospedeiro: ativação da guanilato ciclase C (GC-C) e aumento da produção de GMPc (Savarino *et al.*, 1991; Yamamoto e Echeverria, 1996). Esta toxina induz efeitos citotóxicos causando a contração do citoesqueleto e perda da tensão das fibras de actina (Canizalez-Roman e Navarro-Garcia, 2003). O gene que codifica esta toxina é designado por *astA* e pode ser também encontrado em muitas outras estirpes de *E. coli* incluindo as comensais (Menard e Dubreuil, 2002), o que leva a que estirpes não-EAEC

possam produzir esta toxina e que o seu papel na patógenese seja ainda, para muitos autores, controverso e indique heterogeneidade em termos de virulência nessas bactérias.

### B) Verotoxina

Esta toxina é o principal fator de virulência das estirpes EHEC. A designação de verotoxina (VT) foi estabelecida em 1977 por Konowalchuck *et al.*, que observou que a toxina produzida pela estirpe H19 destruía as células Vero (Konowalchuck *et al.*, 1977). Deve ter-se em conta que, neste estudo inicial, uma das estirpes analisadas era de origem suína e que duas outras foram isoladas de queijos (Konowalchuck *et al.*, 1977; Milon, 1993). Como foi demonstrado que a toxina VT era próxima da toxina tipo 1 produzida pela estirpe 60R da *Shigella dysenteriae*, esta foi igualmente designada por toxina do tipo *Shigella* (*Shiga like toxine*), Stx (Bettelheim e Beutin, 2003; Tarr *et al.*, 2005). Na década de 1980, foi reconhecido que os genes responsáveis pela toxina VT são codificados num bacteriófago (O'Brien *et al.*, 1984) e que mais de 100 serótipos diferentes de *Escherichia coli* podem expressar VT (Karmali, 1989).

As VT são toxinas citotóxicas e levam à morte celular e a muitos outros sintomas em indivíduos infectados com estirpes VTEC. São compostas por cinco subunidades B idênticas (de 7,7 kDa cada), que são responsáveis pela ligação da holotoxina a um recetor glicolípido específico, presente na superfície das células-alvo e uma subunidade A (monómero de 32 kDa), que é clivada proteoliticamente, resultando em dois péptidos: A1 de 28 kDa, que contém a atividade enzimática da toxina (N-glicosidase), e A2 de 4 kDa, responsável por estabelecer a ligação da subunidade A à B (Jackson e O'Brien, 1987; Lingwood, 1987). A estrutura básica das subunidades A-B é conservada em todos os membros da família da toxina VT. Uma vez ligada ao seu recetor, a subunidade A, é internalizada por endocitose, mediada pelo recetor, onde é envolvida por a proteína clatrina, que auxilia o seu transporte através da membrana celular, formando uma vesícula selada com a toxina no seu interior. A vesícula contendo a toxina é transportada através do aparelho de Golgi até o retículo endoplasmático e durante este processo sofre a ação de proteases, nomeadamente a enzima furina, gerando os fragmentos A1 e A2. Enquanto que o fragmento A2 permanece ligado à subunidade B, o fragmento A1 é translocado para o citoplasma, onde exerce uma atividade RNA-N-glicosidase, atuando sobre a molécula de RNA ribossómico e removendo um resíduo de adenina do 28S rRNA. Esta clivagem impede a síntese proteica, ocasionando a morte celular (Sandvig e Van Deurs, 1994; Paton e Paton, 1998b; Kaper *et al.*, 2004).

A família VT contém dois subgrupos: VT1 (ou Stx1) e VT2 (ou Stx2), que compartilham cerca de 55 % de homologia na sequência de aminoácidos (Jackson *et al.*, 1987; Bettelheim

e Beutin, 2003), e que estão ambas associadas a doenças em humanos, apresentando a mesma ação sobre células Vero, mas que diferem na sua toxicidade e distinguem-se entre si pelas suas propriedades biológicas e antigénicas. Estas toxinas são codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, respetivamente. Uma estirpe EHEC pode expressar apenas uma das toxinas, VT1 ou VT2, ambas as toxinas ou até mesmo variantes genéticas das mesmas (Milon, 1993; Bettelheim e Beutin, 2003). A verotoxina do tipo 1 (VT1) é bioquimicamente mais próxima da toxina produzida por *Shigella dysenteriae* do que VT2. O seu receptor nas células eucariotas é a globotriaosilceramida (Gb3), enquanto que a toxina VT2, para além deste recetor, também se pode ligar à variante globotetraosilceramida (Gb4). A verotoxina do tipo 2 (VT2) apresenta uma maior citotoxicidade que VT1 em células celulares e modelos animais (Tesh *et al.*, 1993; Louise e Obrig, 1995; Siegler *et al.*, 2003; Bettelheim e Beutin, 2003) e estudos epidemiológicos mostram que VT2 revela um risco mais elevado de desenvolvimento da patologia HUS (ver 1.2.8) por infeção com a estirpe EHEC (Boerlin *et al.*, 1999). O grupo VT1 apresenta poucas variantes, com comparação a VT2, e estas diferem discretamente na sequência de nucleotídeos, sem que isto tenha consequências sobre as suas características antigénicas e toxicidade (Zhang *et al.*, 2002; Mainil e Daube, 2005). Para VT2 já foram descritas mais de 20 variantes, que são mais divergentes, em relação a VT1, em termos de sequência de nucleotídeos, antigenicidade e toxicidade (Mainil e Daube, 2005).

Estas toxinas são produzidas no cólon e, através da corrente sanguínea, são levadas maioritariamente para os rins (que são as principais células-alvo destas toxinas) e para o cérebro, estômago e submucosa do estômago e intestino. Teoricamente todas as células que apresentem recetores específicos poderão se tornar alvo da ação das VTs (Andreoli *et al.*, 2002).

### 1.2.8. Epidemiologia e doença

As doenças diarreicas permanecem como uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo. As estirpes de *E. coli* DEC são consideradas um agente de grande relevância nas toxinfecções alimentares, sendo uma causa importante de gastroenterites, uma vez que a sua transmissão para os humanos é feita, maioritariamente, por via fecal-oral, com contaminação através de alimentos e águas de consumo (Kuhnert *et al.*, 2000).

As estirpes EPEC são, normalmente, associadas à diarreia do recém-nascido ou a crianças menores de dois anos (maioritariamente em países em desenvolvimento). Infeções em crianças mais velhas e adultos são raras, o que pode estar associado a um desenvolvimento de imunidade ou perda de recetores específicos nas células epiteliais com a idade (Nataro e

Kaper, 1998; Keskimaki *et al.*, 2001; Trabulsi *et al.*, 2002), este facto é também observado noutras categorias de *E. coli*. Estas bactérias causam diarreia aquosa (principalmente diarreia aguda, embora que, em muitos casos, esta se possa tornar prolongada), febre, mal-estar e vômitos (Karper *et al.*, 2004). O período de incubação em adultos pode ser muito curto: 2 a 9 h entre a ingestão destas bactérias e o aparecimento de diarreia e a sua dose infecciosa é de  $10^6 - 10^{10}$  UFC (Donnenberg *et al.*, 1993).

As estirpes EHEC podem originar, em casos menos graves, diarreia aquosa mas não sanguinolenta e em casos mais severos, colite hemorrágica (HC) ou doenças potencialmente fatais como: síndrome urémica-hemolítica (HUS), púrpura trombocitopénica (TPP) e/ou peritonite (perfuração intestinal) (Nataro e Kaper, 1998; Razzag, 2006). A HC caracteriza-se por forte dor abdominal, diarreia aguda, aquosa e sanguinolenta, com possível ocorrência de náuseas e vômito, sem febre. O principal serótipo associado à colite hemorrágica é o O157:H7, que tem sido considerado na última década um importante problema de saúde pública na América do Norte (Rangel *et al.*, 2005) e na Europa (Blanco *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2001). O sangue presente na diarreia deve-se à atividade citotóxica das verotoxinas (VT), que ao provocarem numerosas ulcerações na mucosa do cólon originam severas perdas de sangue. A HUS deve-se à passagem das verotoxinas, através da corrente sanguínea do cólon para os rins e é caracterizada pela destruição dos eritrócitos e insuficiência renal, que podem ser acompanhadas de deterioração neurológica e anemia hemolítica. A TPP promove o envolvimento do sistema nervoso, anemia hemolítica e febre (Ferreira e Sousa, 2000). As complicações causadas por HUS e TPP tornam-se por vezes persistentes e os indivíduos afetados têm que recorrer a transfusões de sangue e diálises. O período de incubação destas estirpes é de 24-36 horas e a sua dose infecciosa de 50-700 UFC.

As estirpes ETEC são a maior causa de diarreia em recém-nascidos de países em desenvolvimento e em adultos de países desenvolvidos, que viajam para essas regiões, vulgarmente designada, nestes casos, por diarreia do viajante, (Nataro e Kaper, 1998; Badri *et al.*, 2009), causada pela contaminação fecal de alimentos e/ou águas de consumo (Kuhnert *et al.*, 2000). Contudo em anos recentes, em países desenvolvidos, as infeções causadas por ETEC vêm sendo associadas a um aumento de surtos domésticos (Devasia *et al.*, 2006). A doença causada por ETEC é caracterizada por diarreia aquosa, causada pela secreção das enterotoxinas termo-lábeis (LT) e/ou termo-estáveis (ST) (Ferreira e Sousa 2000; Karper *et al.*, 2004), geralmente sem sangue, muco, pus, febre ou vômitos, que apenas estão presentes numa minoria de pacientes (Edwards e Ewing, 1972; Levine, 1987). Apresenta um período de incubação curto, manifestando-se 14 a 50 h após a ingestão (DuPont *et al.*, 1971) e a infeção requer uma dose infecciosa de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC. A diarreia

por ETEC pode ser ligeira e breve ou bastante grave, assemelhando-se, neste caso, à infecção por *V. cholerae* (Levine *et al.*, 1977). Sendo que a maioria dos casos que colocam a vida em risco estão relacionados com bebés recentemente desmamados, em países em desenvolvimento.

A maioria dos surtos causados por estirpes EAEC ocorreram em crianças e em países em desenvolvimento, mas existem também surtos em adultos e em países desenvolvidos, onde também são importantes agentes de diarreia (Nataro *et al.*, 1998; Badri *et al.*, 2009). EAEC provocam inflamação intestinal que se manifesta com diarreia aquosa persistente que se pode estender por mais de 14 dias, com presença de muco nas fezes, febre baixa e poucos ou nenhuns vômitos (Paul *et al.*, 1994; Badri *et al.*, 2009). O período de incubação da doença é de 8 a 18 h e a sua dose infecciosa é aproximadamente  $10^{10}$  UFC (Nataro *et al.*, 1995).

As estirpes EIEC podem provocar colite invasiva inflamatória, úlceras e ocasionalmente disenteria, sendo os sintomas mais usuais: febre, calafrios, dores abdominais e diarreia aguda e aquosa com sangue, muco e leucócitos nas fezes. Em casos menos graves, EIEC apenas provocam diarreia aquosa. Sendo por vezes estes sintomas indistinguíveis dos provocados pela infecção de outros patótipos de *E. coli*. O período de incubação é cerca de 24 horas e a sua dose infecciosa aproximadamente  $10^8$  UFC (Marier *et al.*, 1973; Lacasse, 1995).

As estirpes DAEC provocam diarreia aquosa, sem sangue ou leucócitos, muito semelhante a causada por EPEC, mas mais persistente, normalmente em crianças (Baqui *et al.*, 1992) ou em indivíduos imunocomprometidos.

O centro de controlo e prevenção de doenças estima que, apenas nos EUA, só a estirpe *E. coli* O157:H7, causa 73 480 casos de doença e 61 mortes por ano e que as outras estirpes EHEC, não-O157, causem mais 37 740 casos e 30 mortes, estando 85 % desses casos associados ao consumo de comida contaminada (Ge *et al.*, 2002). Embora a taxa de mortalidade por doenças diarreicas no mundo, tenha diminuído nos últimos anos, ainda são registadas cerca de dois milhões de mortes anualmente. A maior parte dos casos ocorre em crianças com menos de cinco anos de idade, residentes em países em desenvolvimento (Petri *et al.*, 2008). Segundo a EFSA e o ECDC, em 2010 na Europa, foram confirmadas e reportadas um total de 4000 infeções causadas por *E. coli* verotoxinogénica (VTEC), sendo a maior parte desses casos causados pelo serogrupo O157. Estes valores representam um aumento de 12%, relativamente a 2009. Este aumento, que é principalmente atribuído à Alemanha e à Holanda, deveu-se a 14 países, sendo que apenas oito reportaram menos casos que em 2009. Num total 31 surtos de origem alimentar, em cerca de 222 casos

confirmados desenvolveu-se HUS, sendo que 65,8% desses casos estão associados a crianças até 4 anos. O principal veículo de transmissão destes surtos, ocorridos em 2010, foi a carne bovina, seguida de leite de vaca cru e queijos produzidos com leite de vaca cru ou submetido a baixos tratamentos térmicos (EFSA e ECDC, 2012).

Recentemente têm ocorrido vários surtos causados por alimentos e águas contaminadas com estirpes de *E. coli*, pertencentes às categorias acima mencionadas, não só em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, o que mostra que a segurança alimentar está longe de ser uma meta atingida. Alguns exemplos desses surtos são apresentados seguidamente.

Os surtos relacionados com a ingestão de alimentos frescos contaminados, como por exemplo, o causado pelo consumo de espinafres frescos pré-embalados contaminados com o serótipo O157:H7 (isolado TW14359), provocou doença a mais de 295 indivíduos em setembro e outubro de 2006, nos EUA (em 26 estados). Um total de 51% das pessoas afetadas foram hospitalizadas, 16% desenvolveu HUS e insuficiência renal e, pelo menos, três morreram (Manning *et al.*, 2008; Kulasekara *et al.*, 2009; Gelting *et al.*, 2011).

O surto com origem na Alemanha, em 2011, causado por *E. coli* O104:H4 (uma nova estirpe EHEC agregativa), que desde maio até junho, que provocou 810 casos de HUS, 2684 casos de diarreia sanguinolenta e 39 mortes. Posteriormente, foram reportados casos provenientes deste surto noutros 16 países da Europa e América do Norte, o que levou a um aumento dos casos de doença para um total de aproximadamente 4075 infeções e 50 mortes até 21 de julho. O veículo de transmissão deste surto foram sementes germinadas (RTE) do Egito, incluídas em saladas. Apesar de, inicialmente, pensar-se que a contaminação se devia a pepinos que provinham de Espanha, hipótese que mais tarde foi desacreditada por análises microbiológicas. Para além dos doentes afetados, causou graves consequências nas trocas comerciais entre países. Vários países impuseram restrições nas importações de vegetais vindos da União Europeia, particularmente de Espanha. Portugal também sentiu o efeito deste surto nas suas importações com uma grande diminuição do consumo de vegetais Portugueses (Bielaszewaka *et al.*, 2011; WHO, 2011; Scheutiz e Caprioli, 2011; Tzschoppe *et al.*, 2012).

### **1.3. *Escherichia coli* na Indústria Alimentar**

A identificação de *E. coli* na Indústria Alimentar é de grande importância, uma vez que a contaminação fecal, de origem humana e animal, constitui um dos maiores riscos sanitários para os alimentos e águas. Esta contaminação pode resultar de uma grande variedade de



fatores podendo, em geral, ser atribuída a matérias-primas contaminadas, contaminação no processamento ou recontaminação pós-processamento (Prescott *et al.*, 2005).

*E. coli* é usada como um indicador de contaminação fecal, para avaliar a segurança e o estado higiénico de certos produtos alimentares, definidos no Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão, de 15 de novembro, e sucessivas alterações (Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão, de 5 de dezembro, atualizado por o Regulamento (CE) nº 365/2010 da Comissão, de 28 de abril, relativos aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (Regulamento (CE) nº 2073/2005; 1441/2007 e 365/2010). Em termos gerais, a presença de alguns microrganismos nos alimentos, nomeadamente os pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, indicam falhas no controlo do processo e/ou a potencial presença de patógenos (Gilbert *et al.*, 2000).

No que respeita às estirpes de *E. coli* patogénicas, como por exemplo o serótipo O157:H7, por representarem um elevado risco para o consumidor, mesmo com baixos níveis de contaminação, estas devem estar ausentes dos alimentos, sendo necessária a sua imediata deteção e a eliminação dos produtos contaminados (Gilbert *et al.*, 2000).

A contaminação dos alimentos por *E. coli* patogénica ocorre numa ampla gama de produtos, entre os quais: carne (normalmente bovina, mas esta bactéria é também encontrada em carne de suínos, ovinos, cervos e aves) e/ou produtos à base de carne (como por exemplo hambúrgueres, carne picada e salsichas); leite não pasteurizado e derivados; saladas contendo legumes crus; frutos ou sumo de frutos não pasteurizado (Read *et al.*, 1992; Getty *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2008); água para beber (Varma *et al.*, 2003) e/ou gelo (Prescott *et al.*, 2005). A sua capacidade de sobreviver em alimentos tão diversificados deve-se ao facto desta bactéria ser muito tolerante, como já referido no ponto 1.1, a valores extremos de pH e temperatura, entre outros, e à sua ubiquidade.

As contaminações com *E. coli* afetam, em grande parte, os alimentos prontos-a-comer (RTE). O grupo de alimentos RTE inclui alimentos normalmente consumidos no mesmo estado em que são vendidos ou distribuídos, não incluindo frutos secos com casca, frutas e legumes crus, destinados ao descasque ou à lavagem pelo consumidor (Millard e Rockliff, 2003; Regulamento (CE) Nº 1441/2007). Devido à natureza diversa destes alimentos, à globalização dos mercados e à sua enorme procura, por causa de um estilo de vida cada vez mais intenso, estes representam um risco acrescido para a saúde do consumidor, quando comparados aos restantes géneros alimentícios, principalmente quando estão envolvidos agentes patogénicos. Considere-se o aumento de estirpes de *E. coli* O157:H7 psicrótroficas, que atualmente tem crescido em vegetais minimamente processados e produtos de carne processada a 4-12 °C, causando colites hemorrágicas (El-Hadedy e El-

Nour, 2012). Os critérios microbiológicos que devem ser cumpridos pelos operadores do setor alimentar para estes produtos são também os indicados no regulamento N° 365/2010 e os valores guia aconselhados pelo INSA (Santos *et al.*, 2000; Regulamento (CE) n° 365/2010).

Na Indústria Alimentar os processos que diminuem os valores de pH e de  $a_w$ , como por exemplo a fermentação e a secagem, respetivamente, são amplamente utilizados como mecanismos de prevenção do crescimento microbiano em alimentos. No entanto, vários estudos efetuados sobre *E. coli*, apontam para que embora a fermentação e/ou a secagem dos produtos possam reduzir o risco da presença deste agente patogénico, em muitos casos não o eliminam completamente. Serve de exemplo o estudo efetuado por Montet *et al.* (2009), que verificaram a resistência de algumas estirpes de *E. coli* produtoras da toxina VT, no processo de fabrico de salsichas fermentadas e submetidas a secagem ou o estudo realizado por Arocha *et al.* (1992), que demonstraram que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver na presença de valores baixos de pH, resultantes da elevada acidez produzida por bactérias lácticas durante a produção de queijo *cottage*. Outros estudos determinaram ainda, que nem o ácido acético, cítrico ou láctico, em concentrações até 1,5%, aplicados em carnes a 20 ou 55 °C, reduzem apreciavelmente a contagem de *E. coli* O157:H7 (Brackett *et al.*, 1994 citado por Zhao e Doyle, 1994) e que não foi observada nenhuma alteração numa população desta bactéria em saladas de carne (pH 5,40 a 6,07) contendo até 40% de maionese, mantidas a 5 °C até 72 horas (Abdoul-Raouf *et al.*, 1993 citado por Zhao e Doyle, 1994).

A temperatura é também um fator muito importante e que permitem predizer o tempo de conservação de um produto alimentar. No entanto, tal como o indicado no ponto 1.1., certas estirpes de *E. coli* conseguem sobreviver nos alimentos a temperaturas, não só de refrigeração, como de congelação ou até mesmo de confeção (Padhye e Doyle, 1992). E certas estirpes resistentes ao ácido apresentam também resistência a processos de secagem (Glass *et al.*, 1992).

Uma boa ferramenta para a Indústria Alimentar, consiste na combinação destes vários fatores (pH, conservantes químicos, temperatura,  $a_w$ , entre outros) na eliminação de agentes patogénicos, no entanto a melhor forma de proteger a saúde do consumidor é evitar a contaminação dos alimentos com estas estirpes. Para isso, a higiene ao longo de toda a cadeia deve ser cuidadosamente monitorizada, principalmente em indústrias como matadouros ou de transformação de carne, onde o contacto da carne com matéria fecal pode acontecer. As indústrias hortofrutícolas e de águas devem controlar, mais periodicamente, a qualidade das suas matérias-primas, sendo mais exigentes com os seus fornecedores, uma vez que estes produtos estão também associados a uma grande

ocorrência de surtos causados por *E. coli*, As contaminações cruzadas devem ser também um foco de preocupação, a contaminação dos alimentos através das mãos dos operadores e/ou equipamentos é crítica (Prescott *et al.*, 2005).

A segurança dos produtos alimentares é garantida pela implementação de medidas preventivas, tais como o cumprimento de Boas Práticas Agrícolas, Boas Práticas de Higiene e Boas Práticas de Fabrico e pela aplicação do sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP), constituindo as análises microbiológicas apenas uma parte do sistema (Santos *et al.*, 2000). Seria também uma boa estratégia adicional apostar mais e melhor na formação dos profissionais da área alimentar. Existem também várias linhas de orientação que podem ser adotadas tais como as estabelecidas pela FAO e OMS no que respeita à caracterização de riscos microbiológicos em alimentos (FAO e OMS, 2009). As medidas de controlo efetivas e normas de higiene adequadas durante a produção, confeção e preparação final dos alimentos, e em particular dos alimentos RTE, devem garantir que os produtos finais sejam, para além de boa qualidade, isentos de organismos patogénicos (Gilbert *et al.*, 2000).

### **1.4. Isolamento e identificação *E. coli***

Existem basicamente três tipos de métodos utilizados para a deteção e contagem de *E. coli* em alimentos: os métodos clássicos, que se baseiam no isolamento em cultura e posterior identificação das colónias suspeitas, por reações bioquímicas; os métodos imunológicos, que exploram a reação antígeno/anticorpo e os métodos moleculares, baseados nos ácidos nucleicos.

#### **1.4.1. Inoculação em meios diferenciais e métodos bioquímicos**

Os métodos de identificação e diferenciação das bactérias requerem o seu isolamento em cultura pura, seguido da análise de múltiplas características fisiológicas, metabólicas e bioquímicas (Ferreira e Sousa, 2000).

Existem vários meios utilizados no plaqueamento seletivo diferencial, entre os quais o CT-SMAC e o TBX. Ambos os meios permitem isolar e diferenciar *E. coli* de várias amostras de produtos alimentares, sendo que as colónias dos microrganismos contaminantes são inibidas. O CT-SMAC baseia-se na incapacidade das bactérias *E. coli* O157:H7 fermentarem o sorbitol (aparecimento de colónias incolores e pequenas, por vezes com halo cor de laranja, após 18-24 h de incubação a 35 ou 42 °C), em contraste com 80 % de outros serótipos e com a maioria dos microrganismos da microbiota intestinal, que têm essa capacidade (aparecimento de colónias maiores e vermelhas) (Wells, *et al.*, 1983; Farmer e

Davis, 1985; De Boer e Heuvelink, 2000; Fujisawa *et al.*, 2002; Biokar Diagnostics, 2009a). O TBX agar tem como objetivo selecionar *E. coli* b-D-glucuronidase – positivas, que se ligam ao substrato cromogénico BCIG, presente no meio. Esta enzima está presente na maior parte dos serótipos (94 a 97 % de *E. coli* de origem humana ou ambiental apresenta b-D-glucuronidase), causando o aparecimento de colónias azuis. Contudo, nem todas as *E. coli* apresentam b-D-glucuronidase, em particular o serótipo O157:H7, formando-se, nestes casos, colónias brancas (Adams, *et. al.*, 1990; Bettelheim e Beutin, 2003; Biokar Diagnostics, 2009b).

Existem vários testes bioquímicos que podem ser utilizados para identificar *E. coli*, como por exemplo os IMViC (indol, hidrólise do citrato, MR e VP), ensaios de fermentação de açúcares (tais como a glucose, lactose, manitol e sucrose) e os testes de oxidase e catalase.

A utilização dos testes IMViC tem como objetivo a diferenciação dos principais grupos de *Enterobacteriaceae*, incluindo assim as bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas, como é o caso de *E. coli*. Esta diferenciação é feita com base nas suas propriedades bioquímicas e reações enzimáticas, na presença de substratos específicos.

O teste do Indol determina a faculdade dos microrganismos degradarem o triptofano, aminoácido essencial, que pode ser oxidado pela atividade enzimática de algumas bactérias, esperando-se no caso de *E. coli* um resultado positivo.

O teste da hidrólise do citrato tem por base a capacidade de fermentação do citrato como única fonte de carbono, tornando o meio mais alcalino devido à formação de carbonato de sódio. Devido a esta mudança de pH, a cor do meio é alterada para a cor do indicador, o azul de bromotimol, incorporado no meio de cultura. Contudo, as estirpes de *E. coli* não utilizam esta fonte de carbono, esperando-se, assim, um resultado negativo.

Os testes de MR e VP são utilizados na diferenciação dos dois principais tipos de enterobactérias anaeróbias facultativas, tendo em conta que depois do crescimento em meio com glucose e utilização de todo o oxigénio disponível, via metabolismo respiratório, segue-se um dos dois tipos de fermentação: ácido-mista ou butileno-glicólica. *E. coli* apresenta um segundo tipo de fermentação ácido-mista, sendo por isso esperado um resultado positivo no teste MR e, consequentemente, um resultado negativo no teste VP (Madigan e Martinko, 2006).

O teste da oxidase é utilizado para detetar a presença ou ausência do citocromo c nas bactérias. Os citocromos c são uma classe de proteínas heme que participam em muitas reações de transferência de eletrões, tais como a cadeia de transporte de eletrões. Estas proteínas não se encontram presentes em *E. coli*, sendo obtido neste teste um resultado

negativo. O teste da catalase destina-se a detetar a produção de catalase em bactérias. Esta técnica tem por base que a maioria das bactérias aeróbias obrigatórias e anaeróbias facultativas sintetiza esta enzima, para se protegerem do peróxido de hidrogénio que lhes é muito tóxico, esperando-se no caso de *E. coli* um resultado positivo.

A principal desvantagem dos métodos clássicos é que estes baseiam-se apenas nas características fenotípicas dos microrganismos, entre as quais a morfologia das bactérias ou a utilização de diferentes substratos específicos. A maior parte das variáveis fenotípicas observadas no laboratório não permite a diferenciação de estirpes, por outro lado, a maior parte destas técnicas necessita de um número elevado de células microbianas (Ferreira e Sousa, 2000). De um modo geral são técnicas morosas que podem levar vários dias (El-Hadedy e El-Nour, 2012). Os métodos moleculares de deteção, identificação e caracterização microbiana baseados no genótipo, permitiram ultrapassar algumas das limitações dos métodos clássicos (Ferreira e Sousa, 2000).

### **1.4.2. Tipificação serológica**

Esta classificação tem por base a presença de várias estruturas que se situam à superfície das bactérias, neste caso a parede, os flagelos e a cápsula e que têm propriedades antigénicas, ou seja, que provocam a formação no organismo hospedeiro de anticorpos específicos. A serotipia diferencia, então, as estirpes de *E. coli* com base na presença dos antígenos somáticos de parede (O), flagelares (H) e capsulares (K) (Edwards e Ewing, 1972; Lacasse, 1995; Lior, 1994; Nataro *et al.*, 1998). Os antígenos O são hidratos de carbono que fazem parte do componente lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular das bactérias Gram-negativas e são compostos por subunidades oligossacarídicas repetidas, onde o tipo, ordem e repetição dos açúcares diferem entre os sorogrupos (Wolf, 1997) e os antígenos H são determinados pela natureza das subunidades repetidas de flagelina. Uma combinação específica de antígenos O e H, define o serótipo de um isolado, sendo que muitos antígenos H estão relacionados com certos antígenos O. Muitas estirpes expressam uma terceira classe de antígenos, antígenos K ou capsulares, que são também importantes na patogénese, sendo ocasionalmente utilizados na serotipagem. Esta classificação é efetuada pela sequência O:K:H (Campos *et al.*, 2004).

Os métodos convencionais de serotipagem são efetuados pelo teste padrão de aglutinação em lâmina, onde são utilizados anti-soros para aglutinar os antígenos somáticos e flagelares estabelecendo assim quais se encontram presentes na estirpe bacteriana (Durso *et al.*, 2007).

Esta técnica apresenta uma boa reprodutibilidade e capacidade de tipificação. Em microbiologia alimentar a serotipagem é, principalmente, importante quando se fazem

inquéritos epidemiológicos ligados a episódios de toxinfecções alimentares, permitindo detetar com maior segurança a origem de uma contaminação (Lacasse, 1995). Contudo, além de uma sensibilidade e especificidade limitada, a serotipagem é um método caro, demorado e é realizada fiavelmente apenas por um pequeno número de laboratórios de referência. Por isso, a deteção de *E. coli* patogénica de origem intestinal tem-se centrado, cada vez mais, sobre outros métodos imunológicos que têm como objetivo detetar a expressão fenotípica de um determinado fator de virulência específico (e que podem apresentar vários formatos, sendo os mais comuns os imunoenaios enzimáticos do tipo ELISA (Ge *et al.*, 2002), os ensaios de imunoprecipitação e os métodos baseados na separação imunomagnética (Padhye e Doyle, 1991), na identificação de certas características que determinam a virulência destes microrganismos, através de ensaios fenotípicos, *in vitro*, ou pela deteção de genes que codificam essas características por métodos moleculares (Nataro e Kaper, 1998).

### 1.4.3. Multiplex PCR

A reação de polimerização enzimática em cadeia (PCR), descoberta em 1983 por Kary Mullis, é o método de amplificação dos ácidos nucleicos melhor desenvolvido e de utilização mais generalizada. O objetivo deste método é determinar a presença ou ausência do(s) gene(s) alvo (Brian *et al.*, 1992; Paton e Paton, 1998a), sendo indicado para a amplificação de uma região específica de DNA que permite a deteção de um determinado *locus* de virulência. Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso por muitos investigadores para detetar, por exemplo, os genes responsáveis pelas verotoxinas (VT) e o gene *eae* de estirpes VTEC, incluindo *E. coli* O157:H7, os genes que codificam as enterotoxinas (LT, ST e EAST), entre outros (Meng, *et al.*, 1996; Bettelheim e Beutin, 2003). Tem por base um segmento de DNA alvo, de tamanho delimitado por dois *primers* específicos, que é amplificado por intermédio de uma DNA polimerase termorresistente (*Taq*) e desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs). A reação de amplificação decorre em ciclos sucessivos, normalmente 30-40 ciclos, que envolvem a desnaturação do DNA alvo, hibridação (emparelhamento dos *primers* com as sequências complementares de DNA), extensão inicial e final (onde a DNA polimerase sintetiza as sequências compreendidas entre os dois *primers*). Uma vez que os produtos produzidos num ciclo, podem ser utilizados como alvo de amplificação no ciclo seguinte, o número de cópias do segmento de DNA delimitado pelos *primers*, teoricamente, duplica em cada ciclo de amplificação (Erich, 1989; Ferreira e Sousa, 2000).

A pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* pode ser efetuada por técnicas de PCR convencionais, porém, nestas técnicas, a investigação dos isolados bacterianos requer um

grande número de reações individuais, o que as torna muito morosas. De forma a contornar esta situação, foi desenvolvido o Multiplex PCR, que tem por base o mesmo princípio mas onde é possível utilizar mais do que um par de *primers*, diferentes entre si, de forma a permitir a amplificação simultânea de mais do que uma sequência-alvo. Assim, torna-se possível num único ensaio analisar a presença ou ausência de vários genes relacionados com a virulência de uma determinada estirpe bacteriana (Wang *et al.*, 1997; Bhagwat, 2003; Bai *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Esta técnica é muito vantajosa na avaliação genética de uma estirpe, tornando-se muito mais rápida que o PCR convencional e com menos custos associados (Fratamico, *et al.*, 1995; Perry *et al.*, 2007). Todavia, quanto mais genes alvo são incluídos numa reação de Multiplex PCR, mais a especificidade de cada par de *primers* e a uniformidade geral da amplificação podem ser questionáveis (Henegariu *et al.*, 1997). Por isso um protocolo de Multiplex PCR requer que cada par de *primer* seja específico para o gene alvo e que não emparelhe consigo próprio nem com outras regiões homólogas, nem que estabeleça grandes estruturas dimerizadas com os outros *primers* presentes na reação (Erich, 1989; Perry *et al.*, 2007). Para estabelecer um procedimento de rotina, para além da escolha cuidadosa dos *primers*, é preciso estabelecer e otimizar outros fatores tais como a temperatura e o tempo dos ciclos de PCR (Wang *et al.*, 1997).

Os produtos amplificados podem ser detetados e analisados após separação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose. A coloração dos fragmentos pode ser efetuada com brometo de etídio (Ferreira e Sousa, 2000) ou pela incorporação de corantes como o GelRed ou GelGreen no gel. O brometo de etídio intercala-se no DNA em cadeia dupla e quando sobre ele incide luz ultravioleta, o DNA emite fluorescência, facilmente visível a olho nu (Ferreira e Sousa, 2000). Este corante é barato, suficientemente sensível e muito estável, todavia representa um risco para a saúde dos utilizadores. Uma forma de ultrapassar este risco é o recurso a corantes, cujo princípio é o mesmo, no entanto são mais seguros para os manipuladores (Biotium, 2008).

Esta técnica permite a pesquisa de fatores de patogenicidade em *E. coli*, revelando-se uma ferramenta útil usada tanto em diagnóstico como em estudos epidemiológicos (Bastian *et al.*, 1998). A principal vantagem dos métodos de amplificação dos ácidos nucleicos é a extrema sensibilidade na deteção *in situ*, mas destacam-se também a sua rapidez e simplicidade, em comparação com os ensaios em linhas celulares (Hill, 1996; Bastian *et al.*, 1998). A grande sensibilidade do método PCR, é também a sua principal desvantagem, uma vez que os produtos amplificados de uma reação podem contaminar reações de PCR subsequentes, originando reações falsamente positivas. Para evitar esse problema, devem seguir-se, escrupulosamente, uma série de medidas, a mais óbvia das quais é separar fisicamente os locais de realização das reações PCR, dos locais de extração dos ácidos nucleicos alvo.

Outras medidas preventivas a adotar, incluem, por exemplo, o uso de pipetas exclusivas e a redução ao mínimo indispensável das manipulações dos tubos contendo os produtos PCR (Ferreira e Sousa, 2000).

Outros métodos moleculares, alguns adaptados de modificações da técnica básica de PCR, também têm vindo a ser utilizados para a deteção de genes virulentos presentes em estirpes de *E. coli*, serve de exemplo o Real Time PCR (RT-PCR) (Ferreira e Sousa, 2000; Livak e Schmittgen, 2001; Bettelheim e Beutin, 2003; Yu, *et al.*, 2006), os Microarrays de DNA (Khodursky *et al.*, 2000; Call *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001; Chizhikov *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005) e o recurso à hibridação com sondas (Woodward *et al.*, 1990; Prescott *et al.*, 2005).

### **1.5. Métodos de avaliação fenotípica da virulência – ensaios *in vitro***

Os testes baseados em animais ou em tecidos celulares são uma útil ferramenta quando se pretende estudar o efeito das interações dos múltiplos fatores de virulência presentes em determinadas estirpes bacterianas, sendo que nenhum dos métodos descritos anteriormente é capaz de efetuar esta análise fornecendo, assim, uma análise complementar para confirmar a patogenicidade de uma estirpe (Roberts *et al.*, 2001).

As culturas celulares permitem a identificação fenotípica da produção de toxinas (Read *et al.*, 1992) assim como a avaliação de vários fatores de virulência, sendo que desta forma o efeito das estirpes DEC sobre as células pode ser medido, sem o recurso a animais.

Existem várias linhas celulares que podem ser utilizadas nestes ensaios tais como: Caco-2 e HT29 (carcinoma do cólon humano), HEp-2 (laringe), Int-407 (jejuno), Vero (rim de macaco verde africano) (Roberts *et al.*, 2001) e CHO (ovários de hamster chinês) (Sears e Kaper, 1996).

A escolha da linha celular assim como o tipo de procedimento a seguir está diretamente dependente do objetivo do estudo científico, devendo as diferentes características de patogénese das categorias DEC (caracterizadas no ponto 1.2.) ser um aspeto crucial nesta seleção. Serve de exemplo os casos apresentados:

O fenótipo das lesões A/E (característico de estirpes EPEC ou EHEC) pode ser identificado através de cultura de células HEp-2 e posterior observação microscópica (Nataro e Kaper, 1998). Já o diagnóstico das infeções causadas por ETEC pode ser feito através da cultura da bactéria em células CHO, nas quais as toxinas causam alterações na morfologia celular visualizadas, microscopicamente, pelo alongamento das células infetadas (Gray, 1995).



Os ensaios realizados em células Vero destinam-se a confirmar a potencial de virulência de isolados EHEC (VTEC). A utilização de culturas de tecidos para detetar a presença destas estirpes tem sido utilizada desde os trabalhos pioneiros de Konowalchuk *et al.* (1977; Bettelheim e Beutin, 2003) e a avaliação da sua citotoxicidade tem sido normalmente efetuada através da análise microscópica da morfologia celular, da integridade membrana citoplasmática (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação, entre outros parâmetros, das células Vero em contacto com as toxinas VT. Contudo, estes ensaios são muito morosos e a citotoxicidade é apenas avaliada pela análise visual dos efeitos citopáticos (Roberts *et al.*, 2001). Atualmente, têm sido desenvolvidos outro tipo de ensaios para avaliar a citotoxicidade destas estirpes, como por exemplo o ensaio colorimétrico que mede a lactato desidrogenase (LDH) libertada pelas células, para o meio extracelular e que pode ser quantificada espectrofotometricamente (Roberts *et al.*, 2001). Embora possam ser utilizados vários tecidos celulares neste tipo de ensaios, Roberts *et al.* (2001) mostraram que as células Caco-2 e as Int-407 não são capazes de diferenciar estirpes produtoras de toxinas VT de estirpes VT-negativas, em ensaios baseados na medição da LDH, e que as células Vero e HEp-2 se mostram capazes de diferenciar estas estirpes, sendo que é nas células Vero que ocorre uma maior libertação de LDH. Esta diferença na sensibilidade à VT, indicada pelo nível de LDH libertado, pode dever-se ao facto da ligação das toxinas à superfície das células ser maior ou menor, caso se trate da linha celular Vero ou HEp-2, respetivamente (Roberts *et al.*, 2001). Isto está relacionado, certamente, com o recetor para as toxinas VT (Gb3) que é abundante nas células Vero (Lingwood *et al.*, 1987) em oposição às células HEp-2 ou a outras linhas celulares, que apresentam uma menor quantidade destes recetores ou apresentam recetores alternativos para VT, mas que mostram uma menor afinidade na ligação destas toxinas (Roberts *et al.*, 2001; Hanashima *et al.*, 2008). O ensaio de citotoxicidade com base na libertação de LDH a partir de células Vero é útil na determinação do potencial de virulência de estirpes de *E. coli* isoladas de alimentos (Maldonado *et al.*, 2005). Este método constitui uma abordagem sensível para quantificar a citotoxicidade, em comparação com outros métodos (Valdivieso-Garcia, *et al.*, 1993). No entanto, é importante ter presente que os valores de percentagem de citotoxicidade obtidos, não são absolutos, uma vez que são calculados com base na libertação de LDH de controlos positivos e negativos, usados em cada ensaio. Um número grande de outros fatores pode ainda ser a causa da grande variabilidade encontrada nos resultados de ensaios que utilizam este método tais como: a saúde das células Vero, condições de manutenção da cultura (entre as quais a composição do meio de cultura), a estabilidade do substrato LDH (que está relacionada com vários fatores entre os quais a proteção suficiente do substrato da luz durante a incubação) e as condições do ensaio (Maldonado *et al.*, 2005).

No entanto, apesar dos novos métodos acarretarem várias vantagens, deve-se ter em conta que para a avaliação dos efeitos citopáticos a microscopia continua a ser uma ferramenta útil, tornando possível a observação de várias alterações causadas nas linhas celulares, pela ação de estirpes de *E. coli* patogénica, tais como lesões celulares graves, vacuolização e morte celular, observados por Roberts *et al.* (2001). A observação de células vivas visa preservar os componentes celulares, por fixação ou congelamento, e a sua visualização é clara em microscopia de contraste de fase ou contraste de interferência diferencial (Alberts *et al.*, 2002).

### 1.6. Enquadramento e objetivos do trabalho

As infeções provocadas pela presença de microrganismos patogénicos nos alimentos e na água de consumo são um problema de saúde pública generalizado. São, por isso, necessárias novas abordagens para a vigilância das doenças infecciosas de origem alimentar. Torna-se imprescindível para a Indústria Alimentar, reconhecer quais os riscos que os microrganismos patogénicos, nomeadamente a *E. coli*, representam para a saúde do consumidor. Conhecer os efeitos que os diferentes patótipos bacterianos provocam nas células hospedeiras e os seus fatores/mecanismos de virulência, permite-nos ter uma vantagem face a estes microrganismos, com vista à sua erradicação.

Este trabalho teve os seguintes objetivos principais:

Em primeiro lugar, pretendeu-se implementar um método de avaliação da virulência de células de *E. coli*, no Laboratório de Microbiologia do ISA. Para tal, constituiu-se uma coleção de trabalho composta por 36 isolados alimentares (RTE) e sete estirpes de referência. Utilizou-se a linha celular Vero e otimizou-se o método para a determinação da citotoxicidade, através de um ensaio colorimétrico que quantifica a morte celular, com base na medição da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).

Em segundo lugar, pretendeu-se, pesquisar efeitos citopáticos, em células Vero infetadas com as toxinas em estudo, por observação microscópica (em contraste de fase e coloração de DAPI).

Por último, pretendeu-se adaptar, no Laboratório de Microbiologia do ISA, um protocolo de Multiplex PCR, utilizado em rotina no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais (pertencente ao INSA), para detetar a presença dos genes *lt*, *st*, *astA*, *stx* e *eae*, que codificam as toxinas LT, ST, EAST1 e VT e proteína intimina, respetivamente.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Estirpes bacterianas utilizadas

Os 43 isolados de *E. coli* utilizados neste estudo encontram-se descritos no quadro 1. Como estirpes de referência foram utilizadas a CBISA 4283, 4284 e 4337 (controles positivos para o gene *stx* e para o gene *eae*), CBISA 4315 (controlo positivo para os genes *lt* e *astA*), CBISA 4316 (controlo positivo para os genes *st* e *astA*) e CBISA 3034 e 3965 (controles negativos para a virulência). As restantes 36 bactérias estudadas são de origem alimentar, isoladas de alimentos prontos-a-comer (RTE) portugueses, no INSA e por Amador *et al.* (2009 e 2011).

Quadro 1 – Descrição das estirpes de *Escherichia coli* utilizadas

Estirpe (CBISA)	Designação/Serótipo/Toxinas/Genes	Fonte/Origem
3034	XL-1-Blue	CBISA
3965	B	CBISA
4253		Amador <i>et al.</i> (2011); Linguiça fumada
4254		Amador <i>et al.</i> (2011); Aparas de carnes frias
4255		Amador <i>et al.</i> (2011); Linguiça fumada
4256		Amador <i>et al.</i> (2011); Linguiça fumada
4257		Amador <i>et al.</i> (2011); Costeletas salgadas
4258		Amador <i>et al.</i> (2011); Costeletas salgadas
4259		Amador <i>et al.</i> (2011); Costeletas salgadas
4260		Amador <i>et al.</i> (2011); Costeletas salgadas
4261		Amador <i>et al.</i> (2011); Linguiça fumada
4262		Amador <i>et al.</i> (2009); Queijo de ovelha curado
4263		Amador <i>et al.</i> (2009); Queijo de ovelha curado
4264		Amador <i>et al.</i> (2009); Queijo de cabra curado
4265		Amador <i>et al.</i> (2009); Queijo de cabra curado
4266		Amador <i>et al.</i> (2009); Queijo de cabra curado
4267		Amador <i>et al.</i> (2009); Queijo de ovelha pasta mole
4268		Amador <i>et al.</i> (2011); Costeletas salgadas
4269		Amador <i>et al.</i> (2009); Queijo de mistura (vaca, ovelha e cabra)
4283	O157:H7; VT (1 e 2), <i>eae</i>	CECT 4783 = ATCC 43895; Hambúrguer de carne
4284	O157:H7; VT (1 e 2), <i>eae</i>	CECT 4267 = ATCC 35150; Fezes humanas
4315	LT, EAST1	INSA
4316	ST, EAST1	INSA C35
4320		INSA 410/07; Alface

<b>Estirpe (CBISA)</b>	<b>Designação/Serótipo/Toxinas/Genes</b>	<b>Fonte/Origem</b>
4321		INSA 425/08; Salada mista
4322		INSA 479/10; Filetes de pescada
4323		INSA 507/09; Massa guisada com carne de porco e brócolos
4324		INSA 617/04; Salada russa com maionese e filetes de pescada
4325		INSA 646/08; Bacalhau com batatas e espinafres
4326		INSA 650/09; Salada mista
4327		INSA 733/07; Almôndegas com massa
4328		INSA 827/05; Hambúrguer de carne
4329		INSA 828/05; Hambúrguer de carne
4330		INSA 829/05; Hambúrguer de carne
4331		INSA 36/08; Pasta de atum
4332		INSA 95/08; Salada mista
4333		INSA 147/09; Queijo fresco
4334		INSA 573/04; Filetes de peixe
4335		INSA 580/07; Sobremesa “Doce da Avó”
4336		INSA 699/08; Salada mista com massa
4337	O157:H7; VT, <i>eae</i>	INSA
4339		INSA 515/09; Arroz de pato
4340		INSA 472/09; Salada de tomate e cenoura

**CBISA** – Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia. **CECT** – *Collección Española de Cultivos Tipo*. **ATCC** – *American Type Culture Collection*. **INSA** – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

As estirpes CBISA Nº 4253 à 4269 foram também utilizadas no trabalho realizado por Amador *et al.* (2010).

## **2.2. Linha celular animal Vero**

Para o estudo da virulência das estirpes bacterianas, consideradas anteriormente, tendo como objetivo a análise dos efeitos citotóxicos provocados pela toxina VT, foi utilizada a linha celular animal Vero (ATCC *Cell Biology Collection* Nº CCL-81). As células Vero, inicialmente isoladas a partir de células epiteliais dos rins do macaco-verde Africano *Cercopithecus aethiops*, foram usadas entre as passagens 66 e 125. Estas células são homólogas com as células do corpo humano (Liao *et al.*, 2010).

## **2.3. Meios de cultura**

### **2.3.1. Meios líquidos**

#### **A) BHI**

O meio BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), utilizado para o crescimento das estirpes de *E. coli* destinadas aos ensaios de citotoxicidade, foi sempre preparado imediatamente antes da sua utilização. A sua preparação consistiu na adição de 37 g de BHI desidratado por litro de água destilada. Sendo, posteriormente, esterilizado por autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Após arrefecimento, à temperatura ambiente, foi distribuído por frascos *Erlenmeyer* de 50 mL (20 mL por frasco).

#### **B) D-MEM**

O meio de cultura D-MEM (*high glucose, with L-glutamine, without sodium pyruvate, sodium bicarbonate*) (Gibco/InVitrogen, Paisley, Escócia), adaptado para o crescimento de células animais por Dulbecco e Freeman (1959), foi utilizado no crescimento da linha celular Vero. Este apresenta na sua constituição os componentes representados no quadro 2.

A sua preparação consistiu na dissolução de 13,38 g de D-MEM desidratado, adicionado de 3,7 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 1 litro de água destilada. Após homogeneização, acertou-se o pH a 7,2 - 7,3 e esterilizou-se por filtração com membrana estéril de 0,22 mm de diâmetro de poro (Millipore, Massachusetts, EUA). Distribuiu-se em alíquotas de 50 mL (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) e conservou-se a temperatura de refrigeração (2 – 8 °C).

**Quadro 2 – Composição do meio de cultura D-MEM**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b><u>Aminoácidos</u></b>	
Glicina	30
L-Arginina • HCL	84
L-Cistina • 2HCL	63
L-Glutamina	584
L-Histidina • HCL • H <sub>2</sub> O	42
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
L-Lisina • HCL	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptofano	16
L-Tirosina • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	104
L-Valina	94
<b><u>Vitaminas</u></b>	
Cloreto de colina	4
Pantotenato D-Cálcico	4
Ácido fólico	4
i-Inositol	7,2
Niacinamida	4
Piridoxal • HCL	4
Riboflavina	0,4
Tiamina • HCL	4
<b><u>Sais inorgânicos</u></b>	
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	200
Nitrato de ferro (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O)	0,1
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	97,67
Cloreto de potássio (KCl)	400
Cloreto de sódio (NaCl)	6400
Fosfato de sódio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O)	125
<b><u>Outros componentes</u></b>	
D-Glucose	4500
Vermelho de fenol	15

### **2.3.2. Meios sólidos**

#### **A) TSA-YE**

O meio TSA-YE foi utilizado para o crescimento das estirpes de *E. coli* e preparado tendo por base o meio TSB desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Dissolveu-se, então, 30 g de TSB num litro de água destilada e suplementou-se o meio com 6 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar-ágar (Iberagar, Coima, Portugal). Seguidamente, foi esterilizado a 121 °C, em autoclave, durante 15 minutos, arrefecido em banho termostaticado a 50 °C (P-Selecta, Barcelona, Espanha) e distribuído em caixas de Petri, em câmara de fluxo laminar. As placas foram armazenadas entre 5-8 °C.

A preparação do meio TSA-YE semi-sólido foi efetuado da mesma forma, contudo a quantidade de ágar-ágar adicionada foi de 10 g.L<sup>-1</sup>, ou seja, metade da concentração utilizada anteriormente.

#### **B) CT-SMAC**

O meio foi preparado dissolvendo 50 g do meio base desidratado (Biokar, Beauvais, França) num litro de água destilada. Esterilizou-se a 121 °C, durante 15 minutos, em autoclave. Após arrefecimento da temperatura para 44-47 °C, em banho de água termostaticado (P-Selecta, Barcelona, Espanha) adicionou-se um suplemento seletivo composto por uma mistura liofilizada de 0,025 mg cefixima e 1,250 mg de telurito de potássio (Biokar, Beauvais, França), previamente dissolvida em 5 mL de água destilada esterilizada. O suplemento foi adicionado no volume de 5 mL por cada 500 mL de meio base preparado. Após homogeneização, o meio completo foi distribuído por caixas de *Petri* e armazenado a 2 – 8 °C, protegido da luz, até ao período máximo de 30 dias.

#### **C) TBX Agar**

O TBX (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) foi preparado solubilizando 30,6 g de meio de cultura desidratado num litro de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos, sendo depois distribuído por caixas de *Petri* e armazenado entre 2 – 8 °C.

#### **D) Agar de citrato**

O meio agar de citrato (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) foi preparado através da adição de 23 g de meio desidratado a 1 litro de água destilada. Posteriormente, foi esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos e colocado em tubos de vidro inclinados. Após solidificação, foi armazenado entre 5 – 8 °C.

## **E) MRVP**

O meio MRVP (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), utilizado nos testes de vermelho de metilo e Voges-Proskauer, foi preparado através da adição de 15 g de meio desidratado a 1 litro de água destilada. Foi distribuído um volume 20 mL de meio por tubos de vidro que foram esterilizados por autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Armazenaram-se os tubos entre 5 – 8 °C.

## **2.4. Soluções**

### **2.4.1. Manutenção da linha celular**

#### **A) Tripsina – Versène**

A preparação da solução de ATV consistiu na dissolução dos componentes apresentados no quadro 3, separadamente. Em seguida, procedeu-se ao acerto do volume final e correção do pH a 7,1 – 7,2. Esterilizou-se a solução através de filtração por membrana com 0,22 mm de diâmetro de poro (Millipore, Massachusetts, EUA) e armazenou-se em alíquotas de 50 mL, a – 20 °C.

**Quadro 3 – Composição da solução de ATV**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Cloreto de sódio (NaCl) (Merck, Darmstadt, Alemanha)	8,0
Cloreto de potássio (KCl) (Merck, Darmstadt, Alemanha)	1,0
Glucose hidratada (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> .H <sub>2</sub> O) (AppliChem, Gaterslebem, Alemanha)	1,1
Hidrogeno carbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> ) (Merck, Darmstadt, Alemanha)	0,58
EDTA hidratado (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O) (Merck, Darmstadt, Alemanha)	0,2
Tripsina (Gibco/InVitrogen, Paisley, Escócia)	2,0

#### **B) Inativação do soro fetal bovino (SFB)**

Este procedimento foi realizado com o objetivo de inativar as proteínas termo-lábeis existentes no SFB, de forma a prevenir possíveis reacções imunológicas contra as células animais. O SFB (Gibco/InVitrogen, Paisley, Escócia) foi, inicialmente, descongelado durante a noite entre 2 – 8 °C e, posteriormente, colocado a 37 °C em banho de água (P-Selecta, Barcelona, Espanha). Após estar completamente descongelado, foi mantido à mesma temperatura por mais 15 minutos, sendo homogeneizado por inversão. Procedeu-se, depois, ao aumento da temperatura do banho de água para 56 °C, agitando-se o soro em cada 10 minutos, até essa temperatura ser atingida. Manteve-se os 56 °C durante 35 minutos, novamente com agitação de 10 em 10 minutos. Por último, arrefeceu-se o soro à



temperatura ambiente e distribuiu-se por alíquotas de 50 mL, que foram armazenadas a – 20 °C.

### **C) Soro fisiológico tamponado**

A preparação da solução de soro fisiológico tamponado consistiu na dissolução dos componentes (Merck, Darmstadt, Alemanha) apresentados no quadro 4, e acerto do volume final. Acertou-se o pH a 6,85 e efetuou-se a esterilização por calor húmido, em autoclave, a 121 °C durante 30 minutos. Distribuiu-se por alíquotas de 50 mL e armazenou-se a 2 – 8 °C.

**Quadro 4 – Composição da solução de soro fisiológico tamponado**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Cloreto de sódio (NaCl)	8,5
Di-hidrogeno fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,0
Hidrogeno fosfato di-potássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,0

### **D) Solução mistura de Penicilina e Estreptomicina (200×)**

As soluções de penicilina (Sigma, St. Louis, EUA) e de estreptomicina (Sigma, St. Louis, EUA) foram preparadas nas concentrações de 100 UI.mL<sup>-1</sup> (1 mg ≈ 1668 UI<sup>1</sup>) e 100 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente. Após a dissolução de ambas, no mesmo volume de água destilada esterilizada, procedeu-se à esterilização da solução final por filtração com membrana estéril de 0,22 mm de diâmetro de poro (Millipore, Massachusetts, EUA). A solução foi distribuída em alíquotas de 1,5 mL que foram armazenadas a -20 °C.

### **E) Solução de L-glutamina (100×)**

A solução comercial de L-glutamina (Sigma, St. Louis, EUA), esterilizada e na concentração de 200 mM, foi distribuída por alíquotas de 1,5 mL e armazenada à temperatura de - 20 °C. Quando foi utilizada, foi diluída para 2 mM.mL<sup>-1</sup>, em meio de cultura DMEM.

### **F) Solução de corante de azul de tripano 0,4% (m/v)**

Preparou-se uma solução aquosa de azul de tripano (Riedel-de Haën, Hanover, Alemanha) a 0,4 % (m/v), com água destilada. Esterilizou-se a solução a 121 ° C, durante 20 minutos, em autoclave e armazenou-se à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

<sup>1</sup>Valor variável consoante o lote.

### **2.4.2. Testes morfológicos e bioquímicos**

#### **A) Água peptonada**

A solução de água peptonada foi preparada dissolvendo 10 g de peptona (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e 5 g de cloreto de sódio (Merck, Darmastad, Alemanha), em 1 litro de água destilada. Após homogeneização, esterilizou-se em autoclave durante 15 minutos, a 121 °C, e armazenou-se entre 5 – 8 °C.

#### **B) Solução de vermelho de metilo**

A solução de vermelho de metilo (*metil red*) foi composta pela adição de 0,1 g do corante *Metil Red* (Analyticals<sup>0</sup>, Milão, Itália) a 300 mL de álcool a 95% (v/v), sendo depois diluída com água destilada até perfazer os 500 mL. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

#### **C) Solução de a-naftol 5% (m/v)**

A solução de a-naftol (Merck, Darmastad, Alemanha) foi preparada a 5% (m/v), dissolvendo 5 g do composto desidratado em 100 mL de álcool etílico. Armazenou-se entre 5 – 8 °C.

#### **D) Solução de creatina 40% (m/v)**

Dissolveu-se 40 g de hidróxido de sódio (Merck, Darmastad, Alemanha) em 75 mL de água destilada e deixou-se arrefecer. Separadamente, dissolveu-se 0,3 g de creatina (Merck, Darmastad, Alemanha) em 25 mL de água destilada. Juntaram-se as duas soluções, fez-se o volume até os 100 mL e homogeneizou-se. Armazenou-se a solução entre 5 – 8 °C.

### **2.4.3. Ensaios de citotoxicidade**

#### **A) Solução de sulfato de polimixina B**

A solução de sulfato de polimixina B (Sigma, St. Louis, EUA) foi preparada na concentração *stock* de 50 mg.mL<sup>-1</sup>. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril de 0,22 µm de diâmetro de poro (Millipore, Massachusetts, EUA) e distribuída por alíquotas de 100 mL. Foi armazenada a temperatura de refrigeração de 2 – 5 °C.

Imediatamente antes da sua utilização, foi diluída para a concentração de trabalho de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

### **B) Solução de gelatina 0,2% (m/v)**

Preparou-se uma solução de gelatina (*from porcine skin, type A*, Sigma, St. Louis, EUA) a 2% (m/v), com água ultrapura esterilizada. Esterilizou-se a solução em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos, e distribuiu-se 5 mL em frascos de 50 mL (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica), formando a solução *stock*, que foi armazenada entre 5 – 8 °C.

Em cada utilização da solução de gelatina perfez-se o volume de uma alíquota até aos 50 mL, com água ultra pura esterilizada, obtendo-se a concentração de trabalho de 0,2% (m/v). Colocou-se a mesma a 37 °C em estufa (Shel lab Co<sub>2</sub> Series, Oregon, EUA), durante 15 minutos e homogeneizou-se.

### **C) Solução de PBS 10× e 1×**

A solução de PBS 10× (para o fixador) foi constituída pela adição dos compostos (Merck, Darmstadt, Alemanha) representados no quadro 5.

**Quadro 5 – Constituição da solução de PBS 10×**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Cloreto de sódio (NaCl)	8,0
Cloreto de potássio (KCl)	0,2
Hidrogeno fosfato di sódio hidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	1,44
Di-hidrogeno fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,24

Após a dissolução dos reagentes acertou-se o pH da solução a 7,2 – 7,4 e esterilizou-se em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos.

A solução de PBS 1× (para a lavagem) foi efetuada a partir da diluição 1:10, da solução de PBS 10×, com água destilada esterilizada.

### **D) Solução de EGTA**

Foi preparada uma solução de 0,5 M de EGTA (Sigma, St. Louis, EUA), adicionando 1,9 g de EGTA desidratado a 10 mL de água ultrapura esterilizada. A solução foi solubilizada com hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

### **E) Solução de fixação com paraformaldeído**

O fixador, utilizado na observação microscópica das células Vero, foi elaborado adicionando 2 g de paraformaldeído (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha) a 37,5 mL de água ultra pura esterilizada. Adicionando-se algumas gotas de hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) até a solução ficar límpida.

Juntou-se à solução 5 mL de PBS 10×, 0,25 mL de cloreto de magnésio 1 M (BHD Chemicals, Poole, Inglaterra), 1 mL da solução de EGTA 0,5 M (Sigma, St. Louis, EUA) e 2 g de sucrose (Sigma, St. Louis, EUA). Acertou-se o pH a 7,4 e armazenou-se o fixador a temperatura de refrigeração (2 – 5 °C), durante o tempo máximo de uma semana.

#### **F) Solução de SSC 20×**

O *buffer* SSC foi preparado na concentração stock de 20× através da dissolução dos componentes, apresentados no quadro 6, em 1 litro água destilada esterilizada.

**Quadro 6 – Composição da solução de SSC 20×**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Cloreto de sódio (NaCl) (Merck, Darmstadt, Alemanha)	175,3
Citrato de sódio tribásico 2-hidratado (Riedel-de-Haën, Hanover, Alemanha)	88,2

Após homogeneização da solução acertou-se o pH a 7 e preparou-se a solução de SSC 2×, diluindo 100 mL da solução *stock* em 1 litro de água destilada esterilizada.

### **2.4.4. Multiplex PCR**

#### **A) TBE 1×**

Utilizou-se como tampão de eletroforese o TBE 1 ×, preparado a partir da diluição de TBE 10× (National diagnostics, Georgia, EUA). A diluição foi efetuada, em proveta, adicionando 200 mL de TBE 10× e perfazendo o volume até 2000 mL com água destilada esterilizada. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente.

#### **B) Solução de agarose 2% (m/v)**

Utilizou-se a agarose *Molecular Biology Grade* (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), que se apresenta como uma agarose *standard* para a separação eletroforética de ácidos nucleicos no intervalo de 50 pb, livre da atividade de DNase e RNase. A solução de agarose foi preparada a 2 % (m/v), adicionando para o efeito 2 g de agarose a 100 mL do tampão TBE 1×. Fundiu-se a agarose e aplicaram-se 5 mL de GelRed *Nucleic Acid Gel Stain* 10 000× (Biotium, Hayward, Califórnia, EUA).

## **2.5. Condições de cultura e de manutenção**

### **2.5.1. Estirpes bacterianas**

As estirpes de *E. coli* encontravam-se armazenadas à temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em TSA-YE com 15 % (v/v) de glicerol. No caso das estirpes CBISA 4253 à 4269, o meio TSA-YE foi suplementado com ampicilina ( $200\text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Os isolados foram inoculados, a partir das culturas originais, em TSA-YE e incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (P-Selecta, Barcelona, Espanha) durante a noite. Depois de confirmada a pureza dos mesmos, foi constituída a coleção de trabalho em tubo inoculado por picada central em meio TSA-YE semi-sólido e incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante a noite. A coleção foi conservada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5.2. Linha celular animal Vero**

Na manutenção da linha celular Vero pretende-se preservar, o melhor possível, as suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas originais, em ambiente artificial, *in vitro*. De forma a assegurar a pureza e viabilidade da linha celular, ao longo de todo o trabalho realizado, toda a manipulação efetuada decorreu em ambiente estéril, em câmara de fluxo laminar vertical, classe II (ScanLaf, LaboGene, Lynge, Dinamarca) e foi utilizado material esterilizado descartável.

As células Vero foram mantidas em frascos de  $75\text{ cm}^2$  (Orange Scientifique, Braine-l'Alleud, Bélgica) com meio de cultura D-MEM completo, ou seja, ao meio D-MEM, descrito no ponto 2.3.1.B, foi adicionado 10 % (v/v) de SFB,  $2\text{ mM.L}^{-1}$  de L-glutamina,  $100\text{ UI.mL}^{-1}$  de penicilina e  $100\text{ mg.mL}^{-1}$  de estreptomicina. Adicionou-se mais L-glutamina ao meio de cultura, para além da já existente na sua composição base, devido à sua ação favorável na proliferação das células particularmente exigentes em energia e síntese de proteínas e ácidos nucleicos atuando, assim, como fonte de energia para a maior parte das células de mamíferos, com elevadas taxas de multiplicação (Neves, 2009; Newsholme, 2001).

A linha celular foi incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em estufa (Shel lab  $\text{CO}_2$  Series, Oregon, USA) com 90 % de humidade e com 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$  em ar.

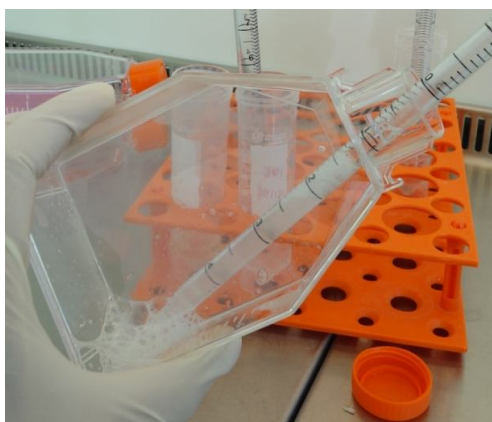
O procedimento de manutenção das células foi realizado semanalmente, sendo estas tripsinizadas sempre que os tapetes celulares se encontrassem confluentes (80-100 %). No intervalo dessas tripsinizações, o meio de cultura era substituído por 25 mL de D-MEM completo. Assim sendo, no primeiro dia (segunda-feira) efetuava-se a tripsinização das células, no terceiro dia (quarta-feira) substituíam-se o meio por D-MEM completo (no mesmo frasco de manutenção) e, por último, no quinto dia (sexta-feira) realizava-se uma nova tripsinização.

A morfologia e o crescimento das células Vero foram observados, ao longo do tempo, em microscópio ótico invertido (Leica, Wetzlar, Alemanha) nos frascos de manutenção, com objetiva 10x (ampliação 100x).

### A) Tripsinização da linha celular Vero

O procedimento de tripsinização, ou passagem, da linha celular consistiu na desagregação das células em confluência, através de um método enzimático e mecânico, permitindo a sua remoção e subcultura, mantendo a cultura celular viável e em crescimento ativo.

Este procedimento consistiu, inicialmente, na eliminação do meio de cultura contido no frasco de manutenção (onde ocorreu o crescimento) e na lavagem do tapete celular com 2 a 3 mL de soro fisiológico tamponado. Após lavagem, retirou-se o soro e colocou-se o mesmo volume de ATV. Esvaziou-se o frasco novamente e adicionou-se mais 4 mL de ATV, incubando o mesmo durante 15 minutos em estufa (Shel lab Co<sub>2</sub> Series, Oregon, EUA), a 37 °C e com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Após esse período, desprende-se a aglomeração das células tripsinizadas por aspiração e retração, como se pode observar na figura 12, e transferiram-se as células para um tubo cônico de 50 mL (Orange Scientifique, Braine-l'Alleud, Bélgica), contendo 4 mL de SFB.



**Figura 12 – Separação das células tripsinizadas por movimentos de aspiração e retração em pipeta** (Fotografia por Suse Guerreiro).

Procedeu-se à lavagem do frasco de cultura, com 8 + 1 mL de soro fisiológico tamponado, sendo este volume transferido para o mesmo tubo que continha as células.

Por último, as células foram centrifugadas (ScanSepeed 1236, Labogene, Lynge, Dinamarca) a  $1000 \times g$ , durante 10 minutos. Após esse tempo, rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 2,7 mL de meio de cultura D-MEM completo, homogeneizou-se e transferiu-se 1 mL desta suspensão para um novo frasco de 75 cm<sup>2</sup> e adicionou-se 24 mL de

meio D-MEM completo. O frasco de cultura foi colocado em estufa nas condições de manutenção descritas anteriormente.

### **B) Contagem e avaliação da viabilidade das células Vero**

Após a tripsinização das células e passagem de 1 mL da suspensão celular para um novo frasco de manutenção, reservou-se o restante volume obtido (aproximadamente 2 mL) no tubo cônico de 50 mL. Homogeneizou-se com uma pipeta (evitando a formação de espuma) e preparou-se uma diluição de 1:7: 50 mL de suspensão celular com 300 mL de azul de tripano 0,4 % (m/v), efetuada em tubo de 1,5 mL. Efetuou-se a contagem do número de células viáveis (não coradas) em câmara de hemocitómetro (Neubauer, Alemanha) através do microscópio invertido (ampliação 100x).

### **C) Conservação por congelação**

As células Vero são mantidas em *stock* à temperatura de congelação de – 80 °C. O procedimento de congelação das células foi realizado semanalmente após a sua tripsinização. Assim, centrifugou-se (ScanSepeed 1236, Labogene, Lynge, Dinamarca) a 1000× *g*, durante 10 minutos, 1 mL da suspensão celular obtida no final do procedimento de manutenção. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 2 mL de meio de congelação ao sedimento celular, ressuspendendo o mesmo e homogeneizado a mistura. O meio de congelação utilizado foi elaborado com 4,5 mL (90 %) de SFB e 0,5 mL (10 %) de DMSO (Sigma, St. Louis, EUA). Colocou-se, por último, 1 mL da suspensão em criotubos esterilizados de 2 mL. Os criotubos foram mantidos em gelo durante, aproximadamente, 30 minutos antes da sua congelação, sendo depois transferidos para – 20 °C e após 24 horas para – 80 °C, até à sua utilização.

A descongelação de células Vero ocorreu em banho de água termostatizado (P-Selecta, Unitronic – Orbital, Barcelona, Espanha) a 37 °C. Posteriormente, juntou-se o conteúdo do criotubo a 10 mL de meio D-MEM completo e homogeneizou-se lentamente. Centrifugou-se a 1000x *g* durante 5 minutos e retirou-se o sobrenadante. O sedimento foi homogeneizado em 15 mL de D-MEM completo, sendo a suspensão celular transferida para um novo frasco de manutenção de 75 cm<sup>2</sup>. A cultura celular foi incubada nas mesmas condições já descritas anteriormente. Contudo, devido a presença de possíveis vestígios de DMSO nas células, o meio de cultura foi mudado com maior frequência e as observações microscópicas realizadas de forma mais constante.

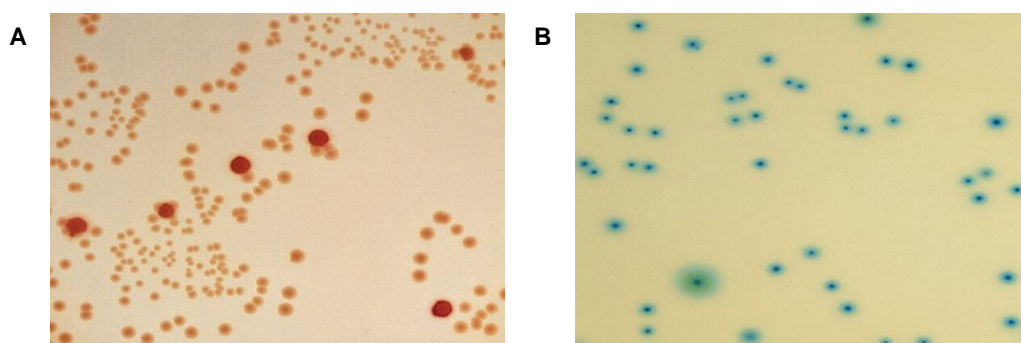
## 2.6. Caracterização fenotípica dos isolados de *E. coli*: testes morfológicos e bioquímicos

De forma a confirmar a pureza das culturas bacterianas e observar a sua morfologia e características bioquímicas, foi efetuada a inoculação das estirpes em placas de CT-SMAC e TBX e foram realizados os testes de coloração de Gram, IMViC (Indol, Vermelho de Metilo – MR, *Voges-Proskauer* – VP e Hidrólise do citrato), oxidase e catalase.

### A) Meios seletivos diferenciais

Inocularam-se as estirpes de *E. coli*, por riscado, nos meios de cultura CT-SMAC e TBX a partir da cultura armazenada em meio TSA-YE semi-sólido. Incubaram-se as placas durante 24 horas, a 37 °C (P-Selecta, Barcelona, Espanha), no meio CT-SMAC e a 44 °C (Compact Co<sub>2</sub> Series, Termolyne, Minnesota, EUA) no meio TBX Agar.

O resultado esperado no meio CT-SMAC, apresentado na figura 13-A, é para bactérias sorbitol negativas o aparecimento de colónias mais pequenas e incolores, por vezes com halo cor de laranja, e para as bactérias sorbitol positivas colónias maiores e vermelhas, sendo as bactérias contaminantes inibidas (Fujisawa *et al.*, 2002; Biokar Diagnostics, 2009a). Já no meio TBX Agar, espera-se em bactérias *E. coli* b-D-glucuronidase – positivas, o aparecimento de colónias azuis, figura 13-B, e para estirpes sem b-D-glucuronidase, o aparecimento de colónias brancas, sendo as colónias de microrganismos contaminantes inibidas (Adams *et al.*, 1990; Biokar Diagnostics, 2009b).



**Figura 13 – Crescimento de *E. coli* nos meios CT-SMAC e TBX.**

**A** – Incubação em CT-SMAC Agar (24 horas/37 °C). *E. coli* O157:H7: colónias pequenas, com halo cor de laranja; *E. coli* não-O157:H7: colónias maiores e vermelhas (Biokar Diagnostics, 2009a). **B** – Incubação em TBX Agar (24 horas/44 °C) *E. coli* não-O157:H7: colónias azuis, pequenas e por vezes com halo. Não são visíveis na figura colónias típicas de *E. coli* O157:H7: colónias brancas (Biokar Diagnostics, 2009b).



### **B) Coloração de Gram**

Inocularam-se as estirpes em TSA-YE a 37 °C, durante a noite (P-Selecta, Barcelona, Espanha) e passado esse período realizaram-se os esfregaços. Estes foram efetuados, em lâminas secas, a partir de colónias isoladas, com água esterilizada e fixados à chama. A coloração de Gram foi efetuada através da utilização de um *Kit* de coloração da BioMerieux (Marcy l'Etoile, França), composto pelas soluções: cristal violeta, lugol, álcool iodado e safranina. Teve-se em conta, na observação microscópica com objetiva 100× (com óleo de imersão, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça), que as bactérias Gram negativas são coradas de vermelho e as Gram positivas de roxo.

### **C) Testes IMViC**

No teste do Indol procedeu-se à suspensão de cada uma das estirpes, anteriormente incubadas em TSA-YE (37 °C, durante a noite) em tubos contendo água peptonada e adicionou-se a cada um dos tubos 1 mL do reagente Kovac (Merck, Darmstadt, Alemanha), deixando em repouso durante 5 minutos. Foi utilizado um tubo não inoculado como testemunha. A presença de uma cor vermelha, que se desenvolve na camada superior da solução de água peptonada, foi considerada como um resultado positivo de produção de indol.

No teste da hidrólise do citrato inocularam-se as estirpes por riscado, em meio agar de citrato (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), incubando-as durante 48 horas, a 30 °C (P-Selecta, Barcelona, Espanha). Teve-se em conta, que *E. coli* não fermenta o citrato e por isso não cresce neste meio, não provocando qualquer alteração de cor. Todavia, é de ter em conta que existem outros tipos de bactérias que são incapazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono e que existem estirpes de *E. coli* atípicas, capazes de usarem o citrato, mudando a cor do meio para azul-escuro.

Para a realização dos testes MR e VP as estirpes foram inoculadas no meio M.R.V.P (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), durante 48 horas a 30 °C (P-Selecta, Barcelona, Espanha), utilizando-se um tubo não inoculado que serviu como testemunha. Após a incubação o conteúdo dos tubos foi dividido em duas partes iguais para outros tubos, sendo uns destinados ao teste MR e outros ao VP. No teste MR adicionou-se 5 a 6 gotas da solução de vermelho de metilo, agitou-se e observou-se a eventual presença da cor vermelha. No teste VP, adicionou-se 10 gotas da solução de a-naftol e agitou-se e adicionou-se de seguida 10 gotas da solução de creatina. Agitou-se novamente e aguardou-se 15 minutos. Por ter uma segunda via de fermentação da glucose ácido-mista, considerou-se que a presença da bactéria *E. coli* era detetada por resultado positivo no teste MR, uma vez que os ácidos

excretados durante esta fermentação originam um decréscimo significativo de pH, e pela presença do indicador a cor do meio é alterada para vermelho. Consequentemente, espera-se um resultado negativo (ausência de observações visíveis) no teste *Voges-Proskauer*, que mede o acetilmetilcarbinol que as bactérias que fermentam por via butileno-glicólica libertam para o meio de cultura.

#### **D) Oxidase e Catalase**

No teste da oxidase a capacidade de produção do citocromo c foi determinada através do reagente dihidroclorato de N,N-dimetil-p-fenilenediamina, que funciona como dador de eletrões à forma oxidada do citocromo c e que está contido numa tira de papel Pyo-Test<sup>0</sup> (Medical Wire & Equipment, Braine-L'Alleud, Wiltshire, Inglaterra). Colocou-se, então, uma tira de papel sobre uma colónia isolada, anteriormente crescida em TSA-YE a 37 °C, durante a noite (P-Selecta, Barcelona, Espanha). Sendo que em *E. coli* o citocromo c não se encontra presente, foi esperado um resultado negativo, isto é, a ausência de modificações (o resultado positivo corresponde à observação de uma coloração violeta ou púrpura escura).

O teste da catalase foi efetuado adicionando algumas gotas de peróxido de hidrogénio 3% (v/v) sobre um esfregaço de células em lâmina seca, a partir de colónias isoladas, inoculadas nas condições descritas anteriormente. Na deteção da produção de catalase em *E. coli* é esperado um resultado positivo, observando-se a formação de bolhas de oxigénio (O<sub>2</sub>↑). Sendo uma bactéria anaeróbia facultativa sintetiza a enzima catalase como proteção à toxicidade do peróxido de hidrogénio, catalisando a sua degradação.

#### **2.7. Curva de calibração (A<sub>600 nm</sub>/ UFC.mL<sup>-1</sup>)**

Procedeu-se à construção de uma curva de calibração para a estirpe CBISA 3965 (*E. coli* B), em BHI, de forma a determinar a concentração das suspensões bacterianas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. As suspensões bacterianas foram efetuadas a partir de colónias isoladas, crescidas por riscado, em TSA-YE, durante a noite a 37 °C. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotómetro (Spectronic 20 D, New York, EUA) a 600 nm.

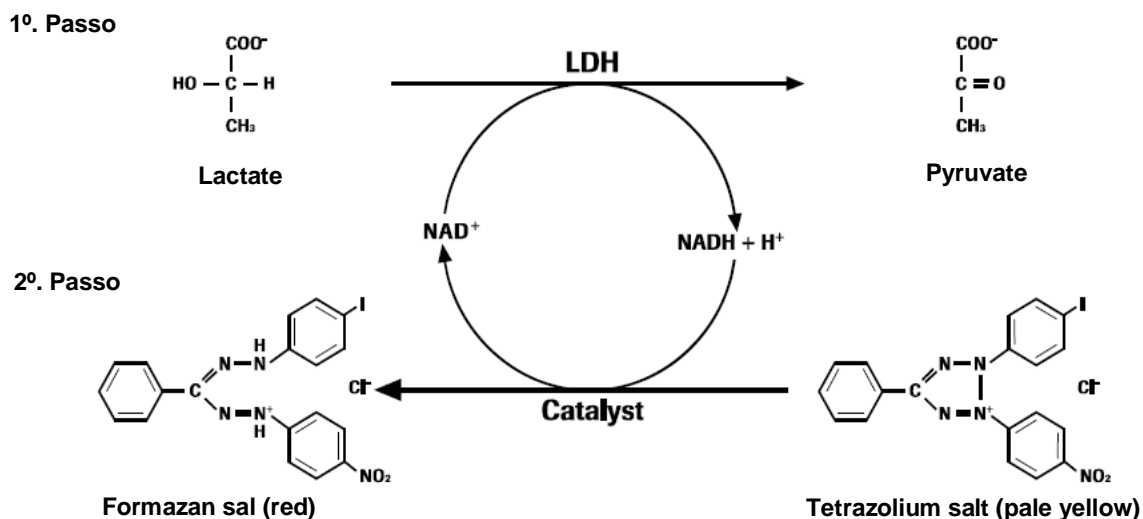
De forma a corresponder os valores de absorvância lidos às respetivas concentrações celulares, foi quantificado o número de UFC.mL<sup>-1</sup> pela técnica de espalhamento à superfície, em triplicado, no meio TSA-YE, através de diluições decimais até à obtenção de placas de possível contagem (30 a 300 UFC/ placa). Através da equação da reta torna-se possível calcular para um determinado valor de A<sub>600 nm</sub> o valor correspondente em UFC.mL<sup>-1</sup>.

## 2.8. Ensaios de citotoxicidade

Para os ensaios realizados, foram usadas como referência as estirpes VTEC CBISA 4283, 4284 e 4337, como controlos positivos (virulentas) e CBISA 3034 e 3965, como controlos negativos (não virulentas) (ver quadro 1). Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar classe II (ScanLaf, LaboGene, Lynge, Dinamarca), com recurso a material descartável ou material de vidro esterilizado em autoclave.

### 2.8.1. Ensaio colorimétrico com base na medição da LDH

A determinação da citotoxicidade, das estirpes de *E. coli* estudadas, consistiu num método colorimétrico para a quantificação da morte celular, com base na medição da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), libertada do citosol de células danificadas para o meio extracelular. O procedimento foi baseado nos estudos descritos por Roberts *et al.* (2001), Jo *et al.* (2004) e Maldonado *et al.* (2005), com algumas modificações. A quantificação da atividade da LDH foi detetada através do *Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup>* (Roche, Indianapolis, IN, EUA), por um teste enzimático, cujo princípio se encontra representado na figura 14, através da medição da absorvância a 490 e a 650 nm (490 – 650 nm), em leitor de microplacas.



**Figura 14 – Princípio do ensaio colorimétrico de quantificação da atividade da LDH.**

Inicialmente a LDH libertada para o meio extracelular reduz o  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}^+/\text{H}^+$ , por oxidação do lactato a piruvato. Seguidamente, o catalisador (diaforase) transfere os  $\text{H}^+/\text{H}^+$  do  $\text{NADH}^+/\text{H}^+$  para o sal de tetrazólio INT, que é reduzido a formazan e que pode ser quantificado através da medição da absorvância, em leitor de microplacas (Roche, 2006).

Os ensaios decorreram em microplacas P96 (NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca) e foram efetuadas três réplicas técnicas e três réplicas biológicas para cada estirpe estudada, sendo apresentado o valor médio calculado, analisado estatisticamente.

A concentração ótima de células Vero a inocular nas microplacas P96 foi determinada de forma a obterem-se poços com uma monocamada confluenta (100%) e homogénea, ao fim de 24 h, onde a quantidade de LDH libertada, naturalmente, pelas células em crescimento, fosse mínima, uma vez que este valor interfere diretamente com os resultados obtidos. De forma a determinar essa concentração, após tripsinização e contagem das células (ver 2.5.2) prepararam-se várias diluições, de uma cultura de células, que foram inoculadas em placas P96, num volume de 100 µL/poço. Para cada diluição, reservaram-se, em cada placa, três poços e destinaram-se também três poços para o controlo negativo (determinação da LDH contida no meio de cultura), nos quais não foram colocadas células. As microplacas foram observadas várias vezes ao dia até se completarem as 24 h. Após este período, selecionaram-se os poços confluentes, sendo os respetivos tapetes celulares submetidos à determinação das absorvâncias a 490 e a 650 nm (490 – 650 nm) (procedimento descrito no ponto 2.8.1-D).

O ensaio foi sempre iniciado no dia em que ocorre a tripsinização das células. Sendo que, no dia anterior, se inocularam por riscado as estirpes de *E. coli* em placas de TSA-YE, a 37 °C em estufa (Memmert, Heilbronn, Alemanha), durante a noite. Após esse período as estirpes foram inoculadas em 20 mL de BHI e colocadas em agitador orbital (Aralab, Rio de Mouro, Portugal) a 37 °C, com 150 rpm, durante 24 h. A concentração de células existente na suspensão, passadas as 24 h, foi determinada utilizando a curva de calibração (ver 2.7).

Deste procedimento fazem parte quatro etapas principais: preparação das microplacas, extração das toxinas, infeção dos tapetes celulares e determinação do valor de absorvância a 490 – 650 nm (diretamente relacionado com a atividade da LDH libertada).

### **A) Preparação das microplacas P96**

Após tripsinização e contagem das células Vero, com azul tripano 0,4 % (m/v), preparou-se uma suspensão celular em meio D-MEM, suplementado com 2 mM.L<sup>-1</sup> de L-glutamina, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço ( $5 \times 10^5$  células/mL). Assegurou-se que a suspensão estava bem homogénea antes da sua aplicação na microplaca, visto que a concentração de células deve ser uniforme em todos os poços para que seja obtida a mesma confluência de células.

Colocou-se 100 µL/poço da suspensão, nos poços interiores das microplacas multipoços de poliestireno P96) e nos poços exteriores adicionou-se 100 µL/poço de soro fisiológico

tamponado, de forma a evitar uma eventual evaporação. Reservaram-se, por microplaca, três poços sem células (apenas com meio de cultura), destinados ao controlo negativo. A microplaca foi colocada em estufa (Shel lab CO<sub>2</sub> Series, Oregon, EUA) a 37 °C com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas (para a formação de uma monocamada 100 % confluyente).

### **B) Extração das toxinas**

Após o crescimento das culturas bacterianas em BHI, descrito anteriormente, transferiu-se 1,5 mL de cada suspensão bacteriana, com aproximadamente  $9 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> (valor estimado pela curva de calibração, ver 2.7), para microtubos esterilizados de 2 mL e centrifugou-se (Eppendorf centrifugue 5415D, Hamburg, Alemanha) a 8160× g, durante três minutos.

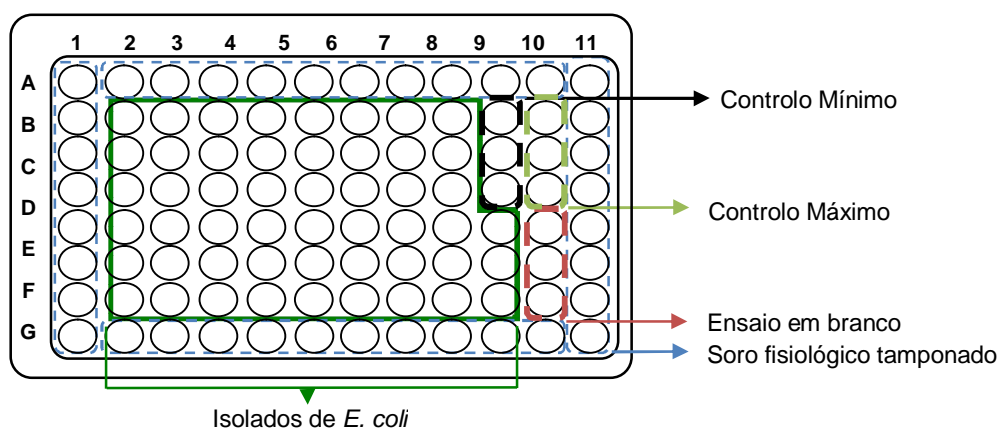
Recolheram-se os sobrenadantes em novos microtubos de 2 mL e armazenaram-se à temperatura de refrigeração (2 – 8 °C). Ressuspendeu-se cada sedimento em 75 mL de uma solução de sulfato de polimixina B (2 mg.mL<sup>-1</sup>), com o objetivo de remover as endotoxinas ligadas à parede celular. O sulfato de polimixina B é um antibiótico com ação bactericida sobre *E. coli* que se liga à parte lipídica do lipopolissacarídeo (LPS) (componente principal da membrana exterior de bactérias Gram negativas), interferindo com a permeabilidade da membrana citoplasmática e contribuindo para a desorção das endotoxinas (Blais *et al.*, 2006; Shouwan *et al.*, 2006). Colocaram-se os tubos a 37 °C, durante 30 minutos, em banho de água termostatzado, com agitação (P-Selecta, Unitronic – Orbital, Barcelona, Espanha). Após este tempo, efetuou-se uma nova centrifugação (Eppendorf centrifugue 5415D, Hamburg, Alemanha) a 8 160 x g, durante 5 minutos e recolheu-se o sobrenadante para o mesmo microtubo de 2 mL (onde estava contido o primeiro sobrenadante extraído). Homogeneizaram-se os microtubos no *vortex* e filtrou-se por seringa com filtros de membrana de 0,2 mm de diâmetro de poro (Millipore, Massachusetts, EUA) para novos tubos de 2 mL esterilizados.

### **C) Colocação das toxinas nos tapetes celulares**

Retirou-se o meio de cultura existente na microplaca P96 e lavaram-se duas vezes os tapetes celulares, em monocamada, com 100 m/poço de D-MEM, suplementado com 2 mM.L<sup>-1</sup> de L-glutamina, utilizando um sistema de aspiração de líquidos VacuBoy (IBS Integra – Biosciences, Zizers, Suíça).

Apenas os poços internos da placa P96 foram utilizados para os ensaios, sendo os poços externos mantidos com a solução de soro fisiológico tamponado. Em cada placa, foram utilizados três poços por amostra (representando as réplicas técnicas), três poços

destinados ao ensaio em branco (controlo negativo), três poços destinados para o controlo máximo (determinando o valor máximo de atividade de LDH que pode ser libertada para o meio extracelular – obtido pela ação de uma solução de lise) e três para o controlo mínimo (determinando o valor mínimo de atividade de LDH libertada normalmente pelas células em crescimento para o meio extracelular – libertação espontânea). A disposição do ensaio pode ser mais clara se for observada pelo esquema representativo da figura 15.



**Figura 15 - Disposição dos isolados de *E. coli* e controlos utilizados nos ensaios de citotoxicidade em microplaca P96.**

Por placa foram, então, testados 17 isolados de *E. coli*. Sendo que o ensaio correspondente a cada placa foi repetido três vezes (réplicas biológicas).

Adicionou-se aos poços destinados às amostras uma mistura homogénea composta por 50 mL de D-MEM (suplementado com 2 mM.L<sup>-1</sup> de L-glutamina) e 50 mL da respetiva toxina, perfazendo um volume total de 100 mL/poço. Em cada um dos poços destinados ao controlo negativo e controlo mínimo adicionou-se 100 mL de meio D-MEM (suplementado com 2 mM.L<sup>-1</sup> de L-glutamina) e em cada um dos poços reservados para o controlo máximo de libertação de LDH adicionaram-se 95 mL, do mesmo meio de cultura. Incubou-se a placa em estufa (Shel lab CO<sub>2</sub> Series, Oregon, EUA) a 37 °C com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>, durante 12 horas. Após o período de incubação, a cada um dos poços usados para o controlo máximo, adicionou-se 5 mL da solução de lise (Roche, Indianapolis, IN, USA) e incubou-se a 37 °C, com agitação (Aralab, Rio de Mouro, Portugal), durante 15 minutos.

Adicionou-se a todos os poços internos da microplaca 100 mL de uma solução de substrato da LDH (contendo uma mistura de *diaphorase* NAD<sup>+</sup>, *iodotetrazolium chloride* (INT) e *sodium lactate*), recentemente preparada de acordo com as indicações do fabricante (Roche, Indianapolis, IN, EUA). Aguardou-se, ao abrigo da luz, durante 5 minutos e, posteriormente, colocou-se em em todos os poços 50 mL de uma solução que se destina a

parar a reação colorimétrica (Roche, Indianapolis, IN, EUA). Agitou-se manualmente durante 10 segundos.

#### **D) Determinação dos valores de absorvância a 490 e a 650 nm**

Transferiu-se 200 mL de cada poço para uma nova microplaca, com a mesma disposição de poços, e procedeu-se à leitura as placas no microplate reader (*model* 680, BIO-RAD, Philadelphia, EUA) a 490 e a 650 nm.

Efetuaram-se, posteriormente, os cálculos da diferença entre os valores de absorvância determinados (490 – 650 nm), para todas as estirpes e controlos. O valor médio de  $Abs_{490\text{ nm}} - 650\text{ nm}$  do ensaio em branco (com apenas meio de cultura), respeitante a cada microplaca P96, foi retirado dos restantes valores de absorvância lidos, que depois foram tratados estatisticamente e, por último, determinou-se a percentagem de citotoxicidade de cada estirpe, através da expressão apresentada em seguida, de acordo com Roberts *et al.*, 2001 e Roche (2006).

$$\% \text{ Citotoxicidade} = [(A_{\text{Exp}} - A_{\text{Controlo Mínimo}}) / (A_{\text{Controlo Máximo}} - A_{\text{Controlo Mínimo}})] \times 100$$

#### **2.8.2. Pesquisa de efeitos citopáticos por observação microscópica**

Para a pesquisa de efeitos citopáticos, isto é, alterações celulares causadas pela ação das toxinas, foi realizada a visualização das células Vero em microscópio Zeiss Axioskop2 (EUA), equipado com câmara digital Zeiss AxioCam MRc5. O crescimento das células Vero foi efetuado em lamela. Este procedimento foi otimizado a partir dos ensaios de citotoxicidade em placa P96, descritos anteriormente, de forma a relacionar o potencial de virulência das estirpes de *E. coli* estudadas com os efeitos visíveis em microscópio das células Vero expostas às toxinas, em condições semelhantes.

Procedeu-se, inicialmente, à observação em microscópio de contraste de fase das células Vero submetidas à ação das toxinas das estirpes de *E. coli* e, posteriormente, observaram-se os núcleos das células Vero por coloração de DAPI.

Em todos os ensaios foi observado um controlo negativo, que respeita às células Vero em normal crescimento, sem contacto com toxinas.

#### **A) Preparação das lamelas**

A preparação das lamelas (24x32 mm) (Chance propper, Warley, Inglaterra), a utilizar para o crescimento das monocamadas de células Vero consistiu num procedimento de lavagem, em suporte apropriado, (Figura 16) com uma solução de acetona pura (Merck, Darmstadt, Alemanha), durante 15 minutos. Após esse período, retiraram-se as lamelas do suporte e

enrolaram-se em papel de alumínio. Foram, posteriormente, colocadas em estufa (Memmert, Büchenbach, Alemanha) a 180 °C, durante três horas para secagem e esterilização por calor seco.



**Figura 16 – Suporte metálico para lavagem das lamelas** (Fotografia por Suse Guerreiro).

### **B) Crescimento das células Vero em lamela**

Para o crescimento das células Vero colocou-se uma lamela, anteriormente preparada, dentro de uma caixa de *Petri* de 55 mm (cada conjunto lamela+caixa de *Petri* representa uma estirpe de *E. coli*). Com uma micropipeta colocaram-se algumas gotas da solução de gelatina a 0,2%, em cima das lamelas, de forma a criar uma camada uniforme (a solução de gelatina não deve transbordar a lamela). Esta solução é usada para promover a aderência das células Vero à superfície da lamela e promover o crescimento do tapete celular nas melhores condições possíveis. Transferiram-se as caixas de *Petri* para a estufa (Shel lab CO<sub>2</sub> Series, Oregon, EUA) a 37 °C com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

Preparou-se meio de cultura D-MEM completo suplementado com 2 mM.L<sup>-1</sup> de L-glutamina e 10% (v/v) de SFB e efetuou-se a tripsinização das células (ver 2.5.2), reservando o sobrenadante já ressuscitado nesse mesmo meio. Procedeu-se à contagem das células viáveis com azul tripano 0,4% (m/v) e efetuou-se a diluição necessária até se obter a concentração final de  $2,5 \times 10^5$  células/mL, com o meio de cultura referido. Estabeleceu-se esta concentração, porque se verificou que os efeitos citopáticos eram mais visíveis e facilmente identificáveis em tecidos celulares que, ao fim de 24 h, ainda não se encontrassem em 100 % de confluência.

Retiraram-se as lamelas da estufa e procedeu-se à lavagem das mesmas com água ultra pura esterilizada (minimizando o risco de contaminações). Transferiu-se 3 mL da suspensão celular para cada caixa de *Petri*, cobrindo toda a superfície da lamela+gelatina e homogeneizou-se, movimentando circularmente as caixas. Colocaram-se as caixas na estufa (Shel lab CO<sub>2</sub> Series, Oregon, EUA) a 37 °C com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.



### **C) Extração das toxinas e infecção do tapete celular**

A extração das toxinas foi efetuada como descrito anteriormente (ver 2.7.2. B).

Após as 24 horas de crescimento das células Vero, retiraram-se as caixas da estufa e eliminou-se o meio de cultura existente, através de uma pipeta. Colocou-se, em cada caixa, uma mistura homogênea composta por 1,5 mL de uma suspensão de toxinas e 1,5 mL de meio D-MEM completo, suplementado com 2 mM.L<sup>-1</sup> de L-glutamina e 10% (v/v) SFB, homogeneizando a placa através de movimentos circulares. Colocaram-se novamente as caixas na estufa Shel lab CO<sub>2</sub> Series, Oregon, EUA) a 37 °C com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, durante 12 horas.

### **D) Observação em contraste de fase**

De modo a preparar as células Vero para observação em microscópio de contraste de fase, eliminou-se o conteúdo das caixas de *Petri* e efetuou-se a lavagem das lamelas com uma solução de PBS 1×. Após se retirar a solução de lavagem, inundou-se com azul tripiano 0,4% (m/v). Passados alguns minutos colocou-se o fixador, importante na preservação da morfologia das células (Williams *et al.*, 1976). Após algum tempo (5 a 8 minutos), retirou-se a solução fixadora e humedeceram-se as lamelas com PBS 1×. Efetuou-se a montagem das lamelas em lâmina para observação ao microscópio de contraste de fase Zeiss Axioskop2 (EUA), equipado com câmara digital Zeiss AxioCam MRc5, com objetiva de 20× (ampliação de 200×). Para tal, depositou-se numa lâmina de microscópio 5 mL de meio de montagem (Citiflour Ltd, Leicester, Inglaterra).

### **E) Observação dos núcleos celulares por coloração de DAPI**

A coloração do DNA nas estirpes, referidas anteriormente, foi efetuada a partir das lamelas preparadas para o procedimento de observação em contraste de fase.

Separaram-se as lamelas das lâminas em suporte apropriado, com uma solução de etanol em água (Merck, Darmstad, Alemanha), preparada na proporção de 3:1 com água esterilizada, arrastando suavemente a lamela, de forma a não alterar a estrutura das células Vero. Colocaram-se as lamelas em novas caixas de *Petri* e realizaram-se as seguintes lavagens:

- Uma lavagem em 2 × SSC com 0,1 % Tween 20 (Sigma, St. Louis, EUA), durante 5 minutos;
- Uma lavagem em 2 × SCC, durante 5 minutos;
- Três lavagens com PBS 1 ×, durante 5 minutos cada, em agitação;

Após as lavagens, colocou-se uma gota do corante fluorescente DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindol (Sigma, St. Louis, EUA) e cobriu-se a preparação com uma nova lâmina, utilizando 5 mL de meio de montagem (Citiflour Ltd, Leicester, Inglaterra). Aguardou-se durante 1 hora em câmara escura a 4 °C. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio de epifluorescência Zeiss Axioskop2 (EUA), equipado com câmara digital Zeiss AxioCam MRc5, com objetiva 63× (ampliação 630×). As imagens foram capturadas usando a excitação e emissão de filtros apropriadas para DAPI.

### 2.9. Multiplex PCR

Os isolados de *E. coli* foram caracterizados molecularmente por Multiplex PCR. O procedimento seguido teve por base o protocolo atualmente existente no INSA, com algumas alterações.

#### 2.9.1. Preparação da amostra

Para a obtenção dos lisados de DNA bacteriano as estirpes de *E. coli* foram inoculadas por riscado em TSA-YE e incubados a 37 °C (Memmert, Heilbronn, Germany), durante a noite. Posteriormente, ressuspendeu-se, com uma ansa, uma colónia isolada de cada estirpe em 1 mL de água ultrapura esterilizada, num microtubo de 2 mL e colocou-se em banho fervente, durante 15 minutos. Após esse período, centrifugaram-se os tubos a  $16000 \times g$ , durante 12 minutos e armazenaram-se os sobrenadantes (DNA) a – 20 °C, até utilização.

#### 2.9.2. Primers utilizados

A utilização dos cinco pares de *primers*, representados no quadro 7, teve como objetivo investigar a presença dos genes *stx*, *lt*, *st*, *astA* e *eae*, que codificam as toxinas VT, LT, EAST1 e ST e a proteína intimina (responsável pela lesão A/E), respetivamente, em todas as estirpes de *E. coli* estudadas. Os *primers* foram sintetizados pela empresa InVitrogen (Paisley, Escócia) e foram utilizados na concentração final de 1 mM.

Quadro 7 – Características dos *primers* utilizados no *Multiplex PCR*

Nome	Sequência (5' - 3')	Referência	Gene-alvo (Toxina ou proteína codificada)	Dimensão do fragmento amplificado (pb)
LT – 1	For: ATT TAC GGC GTT ACT ATC CTC	Woodward <i>et al.</i> (1990)	<i>lt</i> (LT)	280
LT – 2	Rev: TTT TGG TCT CGG TCA GAT ATG			
ST – PR1	For: TCT GTA TTG TCT TTT TCA CC	Frankel <i>et al.</i> (1990)	<i>st</i> (ST)	195
ST – PR2	Rev: TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC			
EAE 23F	For: ACC AGA TCG TAA CGG CTG CCT	<sup>1</sup> A)	<i>eae</i> (Intimina)	499
EAE 25R	Rev: AGT TTG GGT TAT AAC GTC TTC ATT G			
ES – 151	For: GAG CGA AAT AAT TTA TAT GT	Read <i>et al.</i> (1992)	<i>stx</i> (VT)	323
ES – 149	Rev: CGA AAT CCC CTC TGT ATT TGC C			
EAST 11-F	For: CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA	Yamamoto e Echeverria (1996)	<i>astA</i> (EAST1)	114
EAST 11-R	Rev: GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT			

For: *forward* (directo); Rev: *reverse* (reverso).

<sup>1</sup>A) Foi efetuada uma pesquisa usando o BLAST<sup>0</sup> (*Basic Local Alignment SearchTool*) (NCBI, 2011) criado por Altschul *et al.* (1997), que permitiu confirmar que os *primers* EAE23F e EAE25R apresentam homologia com a sequência do gene *eae*, em *E. coli*. A análise do fragmento amplificado resultou do alinhamento das sequências dos referidos *primers* com a sequência do gene *eae*, presente em duas estirpes de *E. coli*, TW14359 e EC4115, cujos genomas se encontram completamente sequenciados por Kulasekara *et al.* (2009) e por Eppinger *et al.* (2011), respetivamente. Em ambos os genomas foi estimada a dimensão do fragmento contido entre os 2 *primers*, obtendo-se o tamanho de 499 pb (anexo I).

### 2.9.3. Reação de amplificação

A amplificação do DNA decorreu num volume de reação de 25 mL, dos quais 1 mL corresponde à amostra a analisar e os restantes 24 mL correspondem aos componentes descritos nos quadro 8.

**Quadro 8** – Composição da mistura de amplificação (para uma reação de 25 mL)

Componentes	Volume (mL)/ Concentração final (mM)
2 × BioMix™ (Bioline, London, Inglaterra)	12,5 <sup>1</sup>
<i>Primers</i>	0,25 <sup>2</sup> / 1

<sup>1</sup> De acordo com as recomendações do fabricante.

<sup>2</sup> Volume a adicionar de cada *primer* direto e reverso, o que corresponde a um volume total de 2,5 mL, relativamente aos cinco pares de *primers* utilizados.

O volume da reação de amplificação foi completado para os 25 mL com água ultrapura esterilizada. Como controlo negativo efetuou-se uma reação onde a amostra foi substituída por igual volume de água ultrapura esterilizada, de forma a testar a ausência de contaminações.

As reações de PCR decorrem num termociclador MasterCycler™ PCR (Eppendorf Scientific, Hamburgo, Alemanha), com *hot lid* a 105 °C e compreendendo os ciclos de desnaturação inicial, desnaturação, emparelhamento dos *primers*, extensão inicial e final, nas condições descritas pelo quadro 9. Os produtos amplificados foram mantidos a 4 °C até à sua utilização.

**Quadro 9** - Ciclos de tempo e temperatura do Multiplex PCR

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação inicial	1	95	5,0
Desnaturação	30	95	1,0
Emparelhamento dos <i>primers</i>		44	0,7
Extensão		72	1,0
Extensão final	1	72	5,0

#### **2.9.4. Visualização e análise dos produtos amplificados**

A resolução dos produtos de PCR foi efetuada em géis de agarose a 2% (m/v), por eletroforese em TBE 1 ×, durante 2:30 horas a 60 V, em tina EC330 Thermo Fisher Scientific (Georgia, EUA). Utilizou-se um volume de amostra por poço de 10 mL, composto por 7 mL do produto amplificado e 3 mL de tampão de amostra (*Gel Loading Solution – Type I*, Sigma, St. Louis, EUA), na diluição de 1/5, em TBE 1×.

Para a determinação das dimensões dos fragmentos de DNA amplificados, utilizaram-se os marcadores moleculares 100 bp DNA Ladder (InVitrogen, California, EUA) e 1 Kb Plus DNA Ladder (InVitrogen, California, EUA) (representados no anexo II), na diluição de 1/10 em *loading buffer*. Foi aplicado um volume de 3 mL de cada marcador, no primeiro e último poço do gel, respetivamente.

Finalizada a corrida eletroforética foi efetuada a visualização do gel e aquisição da fotografia no analisador de imagens Bio-Rad Gel Doc 2000<sup>TM</sup> (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milão, Itália).

#### **2.10. Análise estatística dos resultados**

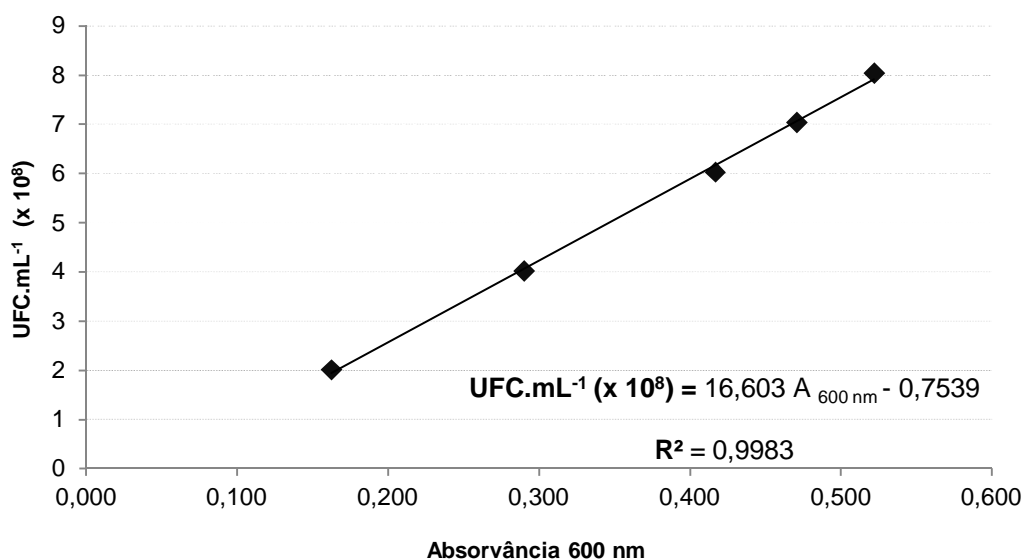
Os resultados relativos aos ensaios de citotoxicidade foram analisados através do programa *Statistica<sup>TM</sup> software* (versão 7.0, Statsoft, EUA). Os valores de absorvância a 490 – 650 nm, a partir dos quais foram calculadas as percentagens de citotoxicidade das estirpes bacterianas, foram testados nas premissas da análise de variância (ANOVA): normalidade da distribuição e homogeneidade das variâncias. Visto que ambas as premissas foram cumpridas, os dados foram sujeitos ao teste de *Tukey HSD*, modelo paramétrico de comparação de médias. Nos testes estatísticos realizados, considerou-se um valor de  $p \leq 0,05$  como indicador de significância estatística.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Ensaios preliminares

##### A) Curva de calibração ( $A_{600\text{ nm}}$ / UFC.mL<sup>-1</sup>)

A figura 17 representa a curva de calibração ( $A_{600\text{ nm}}$  / UFC.mL<sup>-1</sup>) efetuada para a estirpe CBISA 3965 (*E. coli* B), em BHI, de acordo com o método descrito em 2.7. Através da equação da reta tornou-se possível estimar os números de UFC.mL<sup>-1</sup> correspondentes aos valores de absorvância ( $A_{600\text{ nm}}$ ) das suspensões celulares.



**Figura 17 – Curva de Calibração ( $A_{600\text{ nm}}$  / UFC.mL<sup>-1</sup>) para *Escherichia coli* B (CBISA 3965) em BHI.**

A curva de calibração foi efetuada a partir de colónias ressuspensas em BHI, provenientes de placas de TSA-YE, incubadas a 37 °C durante a noite.

##### B) Concentração de células Vero a utilizar nos ensaios de citotoxicidade

A concentração ótima de células Vero a depositar nas microplacas P96 foi determinada de forma a obterem-se poços com uma monocamada confluenta (100 %) e homogênea, ao fim de 24 horas e onde a quantidade de LDH, naturalmente libertada pelas células em crescimento, fosse mínima, uma vez este valor interfere, diretamente, com os resultados obtidos (de acordo com o procedimento mencionado no ponto 2.8.1).

Os poços inoculados com a concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL foram os que originaram um menor valor de absorvância a 490 nm e a 650 nm, isto é, foi nesta concentração que ocorreu uma menor quantidade de LDH libertada pelas células. Teve-se em conta também que, por observação microscópica, esta foi a menor concentração onde, ao fim de 24 horas, os poços se mostraram confluentes. Assim sendo, foi esta a concentração escolhida para o ensaio.

### 3.2. Caracterização fenotípica dos isolados de *E. coli*: análise morfológica e bioquímica

Foi efetuada a análise morfológica e bioquímica de todos os isolados RTE e estirpes de referência de *E. coli* utilizadas neste trabalho (ver quadro 1, páginas 34 e 35) através dos métodos clássicos: meios seletivos diferenciais (CT-SMAC e TBX), coloração de Gram, IMViC, oxidase e catalase.

A caracterização fenotípica mostrou que os isolados RTE, assim como as estirpes de referência, apresentaram um perfil idêntico para as seguintes provas: coloração de Gram (Gram negativo), produção de indol (positivo), utilização do citrato (negativo), segunda via de fermentação ácido-mista (resultado positivo no teste RV e resultado negativo no teste VP), ausência de citocromo C (oxidase negativa) e produção de catalase (positivo).

Estes resultados apontam para o perfil característico de *E. coli*, uma vez que esta bactéria é: Gram negativa; produtora de indol a partir da degradação do aminoácido triptofano; não utiliza o citrato como única fonte de carbono; tem uma segunda via de fermentação ácido-mista; não possui a enzima citocromo c – oxidase (apresentando outros agentes redutores e oxidantes, tais como a hidrogenase) e é produtora de catalase, que a protege do peróxido de hidrogénio, decorrente do metabolismo celular.

Os resultados obtidos nos meios seletivos diferenciais encontram-se representados no quadro 10.

Quadro 10 – Resultados obtidos em meios seletivos diferenciais, Multiplex PCR e ensaios de citotoxicidade (LDH libertada por células Vero)

Isolados	Meios seletivos diferenciais (cor das colónias)		Multiplex PCR <sup>2</sup>					Vero	
			<i>stx</i>	<i>lt</i>	<i>st</i>	<i>astA</i>	<i>eae</i>	LHD ( $A_{490-650\text{ nm}}$ ) <sup>3</sup>	(%) <sup>4</sup>
Controlo mínimo								0,161 ± 0,016	
Controlo máximo								1,773 ± 0,160	
<b>3034</b> (XL-1-Blue) <sup>1</sup>	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,243 ± 0,003 <b>A</b>	5,056
<b>3965</b> ( <i>E. coli</i> B) <sup>1</sup>	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,236 ± 0,007 <b>A</b>	4,628
<b>4283</b> (O157:H7) <sup>1</sup>	Brancas	Brancas	+	–	–	–	+	0,676 ± 0,001 <b>E</b>	31,971
<b>4284</b> (O157:H7) <sup>1</sup>	Brancas	Brancas	+	–	–	–	+	0,547 ± 0,004 <b>F</b>	23,953
<b>4337</b> (O157:H7) <sup>1</sup>	Brancas	Brancas	+	–	–	–	+	0,671 ± 0,006 <b>E</b>	31,612
<b>4315</b> <sup>1</sup>	Vermelhas	Azuis	–	+	–	+	–	0,303 ± 0,004 <b>BD</b>	8,806
<b>4316</b> <sup>1</sup>	Vermelhas	Azuis	–	–	+	+	–	0,302 ± 0,002 <b>BD</b>	8,717
4253	Vermelhas	Azuis	–	–	+	–	–	0,290 ± 0,004 <b>BC</b>	8,000
4254	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,245 ± 0,003 <b>A</b>	5,221
4255	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,241 ± 0,001 <b>A</b>	4,952
4256	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,239 ± 0,002 <b>A</b>	4,856
4257	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,239 ± 0,003 <b>A</b>	4,849
4258	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,238 ± 0,001 <b>A</b>	4,801
4259	Vermelhas	Azuis	–	–	+	–	–	0,304 ± 0,002 <b>BD</b>	8,889
4260	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,293 ± 0,033 <b>A</b>	8,179
4261	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,254 ± 0,005 <b>A</b>	5,738
4262	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,242 ± 0,002 <b>A</b>	5,007
4263	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,250 ± 0,002 <b>A</b>	5,504
4264	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,251 ± 0,002 <b>A</b>	5,573
4265	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,244 ± 0,002 <b>A</b>	5,118
4266	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,256 ± 0,001 <b>A</b>	5,862
4267	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,251 ± 0,007 <b>A</b>	5,607
4268	Vermelhas	Azuis	–	–	+	–	–	0,299 ± 0,005 <b>BD</b>	8,586
4269	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,247 ± 0,009 <b>A</b>	5,325
4320	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,255 ± 0,003 <b>A</b>	5,842
4321	Vermelhas	Azuis	–	+	–	–	–	0,307 ± 0,007 <b>D</b>	9,061
4322	Vermelhas	Azuis	+	–	–	–	–	0,482 ± 0,004 <b>G</b>	19,926



Isolados	Meios seletivos diferenciais (cor das colónias)		Multiplex PCR <sup>2</sup>					Vero	
			<i>stx</i>	<i>lt</i>	<i>st</i>	<i>astA</i>	<i>eae</i>	LHD ( $A_{490-650 \text{ nm}}$ ) <sup>3</sup>	(%) <sup>4</sup>
4323	Brancas	Brancas	+	–	–	–	–	0,579 ± 0,011 <b>H</b>	25,952
4324	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,241 ± 0,009 <b>A</b>	4,987
4325	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,247 ± 0,011 <b>A</b>	5,352
4326	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,258 ± 0,007 <b>A</b>	6,035
4327	Brancas	Brancas	+	–	–	–	–	0,614 ± 0,014 <b>I</b>	28,075
4328	Vermelhas	Azuis	–	(+)	–	–	–	0,263 ± 0,007 <b>C</b>	6,304
4329	Vermelhas	Azuis	–	+	–	–	–	0,291 ± 0,003 <b>BC</b>	8,075
4330	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,254 ± 0,006 <b>A</b>	5,766
4331	Brancas	Brancas	+	–	–	–	–	0,594 ± 0,003 <b>H</b>	26,869
4332	Brancas	Brancas	+	–	–	–	(+)	0,505 ± 0,006 <b>J</b>	21,367
4333	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,258 ± 0,005 <b>A</b>	6,028
4334	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,254 ± 0,004 <b>A</b>	5,745
4335	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,239 ± 0,004 <b>A</b>	4,835
4336	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,273 ± 0,022 <b>A</b>	6,945
4339	Vermelhas	Azuis	–	–	–	–	–	0,239 ± 0,005 <b>A</b>	4,808
4340	Vermelhas	Azuis	–	+	–	–	–	0,302 ± 0,005 <b>BD</b>	8,730

<sup>1</sup>Estirpes usadas como referência para os genes de virulência (4283, 4284 e 4337, 4315, 4316) e como controlos negativos da virulência (3034 e 3965).

<sup>2</sup>A presença (+) ou ausência (-) dos genes *stx*, *lt*, *st*, *astA* e *eae*, que codificam para as toxinas VT (Stx), LT, ST, EAST1 e para a intimina, respetivamente, foi determinada por Multiplex PCR (ver Figura 18).

<sup>3</sup>Os valores de LDH apresentados correspondem à média de três réplicas biológicas (e cada réplica biológica compreendeu um ensaio em triplicado, réplicas técnicas). Destes valores foram descontadas as médias dos ensaios em branco, correspondentes a cada placa P96 (absorvância existente no meio de cultura). As médias (± desvio padrão) que estão marcadas com as mesmas letras (A, B, C, ...) não são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>4</sup>O cálculo da percentagem de citotoxicidade foi baseado na quantidade de LDH libertada relativa ao controlo mínimo (quantidade de LDH libertada naturalmente pelas células durante o seu normal crescimento) e ao controlo máximo (quantidade máxima de LDH libertada pelas células quando sujeitas a uma solução de lise). Esta percentagem foi calculada pela seguinte expressão:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = [(A_{\text{Exp}} - A_{\text{Controlo Mínimo}}) / (A_{\text{Controlo Máximo}} - A_{\text{Controlo Mínimo}})] \times 100$$

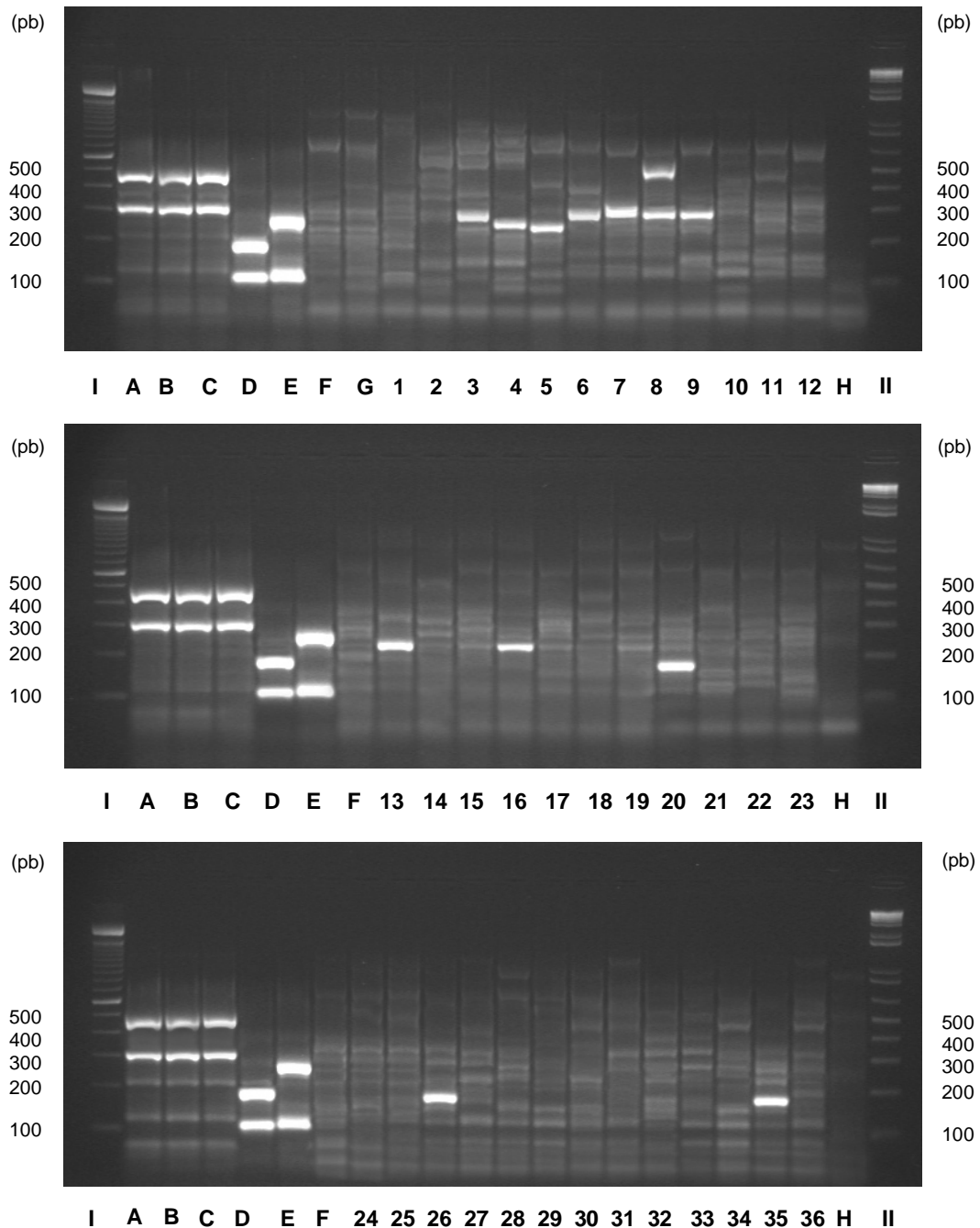
Tendo em conta o quadro 10, quatro dos isolados RTE (4323, 4327, 4331 e 4332), em meio CT-SMAC e TBX, apresentam ausência de coloração (cor branca), tal como as três estirpes de referência O157:H7 (4283, 4284 e 4337), indicando que, aparentemente, pertencerão a este serótipo. O meio CT-SMAC possui sorbitol, que é utilizado pela maioria das estirpes de *E. coli*, que neste meio apresentam colónias de coloração avermelhada, contudo as estirpes pertencentes ao serótipo O157:H7 não conseguem utilizar o sorbitol, pelo que neste meio as colónias características são incolores (brancas). No caso do TBX, as colónias características de *E. coli* O157:H7 são incolores porque as estirpes deste serótipo não produzem b-glucuronidase, logo não utiliza o substrato b-glucorónido, presente no meio, ao contrário do que acontece com os outros serótipos não-O157:H7 (b-glucuronidase positivos), o que neste caso se traduz pelo crescimento de colónias azuis, devido à presença desta enzima.

Assim, avaliando todos os testes efetuados, confirmou-se a identificação de todas as estirpes analisadas como *E. coli*. Quatro isolados RTE (4323, 4327, 4331 e 4332) poderão ser O157:H7, contudo devem ser submetidos a confirmação serológica ou a outros métodos imunológicos (como por exemplo, os ensaios ELISA).

### 3.3. Multiplex PCR

No processo de implementação no ISA do protocolo de Multiplex PCR do Laboratório do INSA, foram testadas várias temperaturas (de 40 a 50 °C) e tempos (de 0,40 a 1 minutos) de emparelhamento dos *primers*, de forma a selecionar as condições mais adequadas, isto é que permitiam uma boa amplificação dos genes-alvo e onde o aparecimento de bandas de amplificação não específica fosse minimizado. Tal facto foi mais evidente a 44 °C e com 0,7 minutos, sendo por isso estas as condições de emparelhamento escolhidas para os ensaios.

A presença ou ausência dos genes que codificam para a virulência: *stx*, *st*, *lt*, *eae* e *astA*, foi avaliada para todas as estirpes utilizadas neste trabalho (Quadro 1), utilizando-se como referência as estirpes O157:H7 CBISA 4283, 4284 e 4337 (genes *stx* e *eae*); CBISA 4315 (genes *lt* e *astA*); CBISA 4316 (genes *st* e *astA*) e CBISA 3034 (XL-1-Blue) e 3965 (*E. coli* B) (como controlo negativo para estes genes). A figura 18 mostra os resultados obtidos no Multiplex PCR para os genes de virulência estudados.



**Figura 18 – Padrão de amplificação dos genes de virulência (*stx*, *st*, *lt*, *eae* e *astA*) dos isolados de *E. coli* em gel de agarose a 2 % (m/v).**

Os painéis de fotografias encontram-se organizados por colunas - **I**: Marcador de massa molecular 100 bp DNA Ladder; **II**: Marcador de massa molecular 1 Kb plus DNA Ladder. **A, B e C**: Estirpe 4283, 4284 e 4337, respetivamente (controlos positivos para o genes *stx* (323 pb) e *eae* (499 pb)); **D**: Estirpe 4316 (controlo positivo para o genes *st* (195 pb) e *astA* (114 pb)); **E**: Estirpe 4315 (controlo positivo para o genes *lt* (280 pb) e *astA* (114 pb)); **F**: Estirpe 3965 – *E. coli* B (controlo negativo); **G**: Estirpe 3034 – *E. coli* XL-1-Blue (controlo negativo); **H**: Ensaio em branco (sem DNA). Os números de 1 a 36 dizem respeito às estirpes isoladas dos alimentos prontos-a-comer (RTE): **1**: 4330; **2**: 4334; **3**: 4327; **4**: 4329; **5**: 4328; **6**: 4331; **7**: 4323; **8**: 4332; **9**: 4322; **10**: 4333; **11**: 4320; **12**: 4326; **13**: 4321; **14**: 4325; **15**: 4324; **16**: 4340; **17**: 4336; **18**: 4335; **19**: 4339; **20**: 4353; **21**: 4254; **22**: 4255; **23**: 4256; **24**: 4257; **25**: 4258; **26**: 4259; **27**: 4260; **28**: 4261; **29**: 4262; **30**: 4263; **31**: 4264; **32**: 4265; **33**: 4266; **34**: 4267; **35**: 4268; **36**: 4269.

Através da figura 18, no que respeita às estirpes utilizadas como controlo, observou-se que o padrão de bandas de amplificação obtido para cada patótipo está de acordo com o indicado no quadro 7, o que mostra que o método utilizado é capaz de detetar a presença destes genes de virulência. O tamanho de amplificação esperado em (pb) está de acordo com as referências para cada *primer*: gene *stx* – 323 pb (Read *et al.*, 1992); *lt* – 280 pb (Woodward *et al.*, 1990); *st* – 1995 (Frankel *et al.*, 1990); *astA* – 114 (Yamamoto e Echeverria, 1996) e *eae* – 499 (pesquisa efetuada usando o BLAST, NCB 2011).

As colunas F e G, que respeitam às estirpes 3965 (*E. coli* B) e 3034 (XL-1-Blue), utilizadas como controlos negativos para os genes de virulência estudados, não apresentam bandas de amplificação, o que vai de acordo com o esperado, sendo que estas estirpes podem ser usadas como controlos negativos, nestes ensaios. Relativamente ao resultado do ensaio em branco, coluna G, este mostra que não houve qualquer contaminação dos materiais e reagentes utilizados nestes ensaios, com DNA, uma vez que não é observada qualquer amplificação.

Nos isolados 4327, 4331, 4323, 4332 e 4322 (Fig. 18, colunas 3, 6, 7, 8 e 9, respetivamente) observou-se a presença de fragmentos de cerca de 323 pb o que indica, comparando com os controlos (estirpes 4283, 4284 e 4337 (Fig. 18, colunas A, B e C), a presença do gene *stx*, que codifica para a toxina VT (Stx). A estirpe 4332 (coluna 8), para além do gene *stx*, poderá apresentar também um fragmento de amplificação do gene *eae*, que codifica a proteína intimina responsável pela lesão A/E. De facto, o fragmento amplificado (cerca de 500 kb) é ligeiramente superior ao dos controlos (4283, 4284 e 4337). Este gene apresenta uma grande heterogeneidade genómica, ainda mais acentuada em estirpes EHEC do que em EPEC (Louie *et al.*, 1994; Willshaw *et al.*, 1994; Utyttendaele *et al.*, 1999). A análise das sequências nucleotídicas deste gene, a partir de diferentes estirpes EHEC e EPEC, mostrou um elevado grau de homologia nos dois primeiros terços (5') do gene e um significativo grau de heterogeneidade no terço final (3') do gene (Adu-Bobie *et al.*, 1998; China *et al.*, 1999a e b; Oswald *et al.*, 2000; Tarr and Whittam, 2002; Zhang *et al.*, 2002b; Ramachandram *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2004a e b; Blanco *et al.*, 2005; Garrido *et al.*, 2006; Ugrinovich *et al.*, 2007). Esta heterogeneidade pode ser manifestada pela deleção de um segmento do cromossoma (pesquisa em NCBI, 2012). O primer reverso para o gene *eae*, usado neste trabalho, foi desenhado a partir do terço terminal do gene, o que poderá, eventualmente, explicar esta diferença de tamanho do fragmento amplificado. No entanto, esta hipótese necessita de confirmação.

Nas colunas 4, 5, 13 e 16, que representam os isolados 4329, 4328, 4321 e 4340, respetivamente, verifica-se a presença de fragmentos de cerca de 280 pb o que indica a presença do gene *lt* (comparando com a estirpe controlo 4315, representada pela coluna E), que codifica a enterotoxina LT. Contudo, a estirpe 4328 (coluna 5), suscita algumas dúvidas uma vez que a banda de amplificação se apresenta ligeiramente inferior do que nas outras

estirpes, devendo ser alvo de outros ensaios, como por exemplo hibridação com sonda, para confirmação.

A presença do gene *st* (195 pb), que codifica a enterotoxina ST, foi detetada nas estirpes 4253, 4259 e 4268, representadas pelos números 20, 26 e 35, respetivamente, tendo em conta a estirpe 4316 (letra D) utilizada como referência para este gene.

Nenhum dos isolados mostrou amplificação para o gene *astA* (114 pb), que codifica a toxina EAST1, tendo em conta as estirpes controlo 4315 e 4316.

Assim, das 36 estirpes isoladas de alimentos RTE, cinco indicam a possível presença de EHEC (mais precisamente VTEC) e sete de ETEC, em que quatro dos isolados expressam o gene *lt* e os restantes três, o gene *st*. Destas estirpes consideradas VTEC, quatro (4323, 4327, 4331 e 3232) apresentaram ausência de coloração nas colónias crescidas em CT-SMAC e TBX, o que está de acordo com os resultados obtidos, indicando que estas estirpes são aparentemente O157:H7 (contudo, deve proceder-se a confirmação serológica) e que apenas uma (4322) se mostrou sorbitol e b-glucuronidase positiva, o que indica que, aparentemente, esta estirpe pertence a outro serótipo VTEC não-O157:H7.

As estirpes que se revelaram VT-positivas foram isoladas de filetes de pescada (4322); massa guisada com carne de porco e brócolos (4323); almôndegas com massa (4327); pasta de atum (4331) e salada mista (4332); as estirpes LT-positivas de salada mista (4321); hambúrguer de carne (4328 e 4329) e de salada de tomate e cenoura (4340); e as estirpes ST-positivas de linguiça fumada (4353) e de costeletas salgadas (4259 e 4268). Estes resultados revelam que a Indústria Alimentar ainda apresenta falhas, no que respeita à segurança dos seus produtos, sugerindo que, nestes casos, foram utilizadas matérias-primas contaminadas e/ou que existiu contaminação no processamento e/ou venda, por via dos operadores e/ou materiais e equipamentos que entraram em contacto com os alimentos no processo de fabrico. A presença de DEC em alimentos RTE torna-se uma preocupação adicional para a Indústria Alimentar, que deve tomar medidas eficazes de forma a prevenir e/ou erradicar estes patogénios dos alimentos, evitando que a saúde do consumidor seja posta em causa.

Em 25 dos 36 isolados testados, o ensaio de Multiplex PCR revelou-se negativo para os genes de virulência pesquisados.

O facto de, em alguns casos, terem ocorrido bandas de hibridação não específica, pode estar relacionado com a existência de alguma interação indesejada entre os *primers*, devido ao seu elevado número (10 *primers*) no mesmo microtubo de reação. Isto é também salientado por outros autores, entre os quais Kim *et al.* (2010), que nos seus ensaios revelam que, apesar das vantagens do método Multiplex PCR, maioritariamente ao proporcionar uma análise rápida de vários genes de virulência em simultâneo, também apresenta algumas desvantagens. Estes autores consideram que, em primeiro lugar, é

essencial que os fragmentos difiram entre si pelo menos 20-30 pb e que, além disso, deve ser dada grande atenção à possível interação entre os *primers*, devido ao seu elevado número na mesma reação PCR. Henegariu *et al.* (1997) consideram que quantos mais genes são incluídos numa reação de Multiplex PCR, a especificidade de cada par de *primers* e uniformidade das amplificações podem tornar-se um problema. Ainda segundo estes autores, a eficácia do emparelhamento de cada par de *primers* pode variar devido ao seu conteúdo GC e a pequenas diferenças de comprimento e de temperatura de emparelhamento, o que pode ser a causa de amplificação não específica, em condições de multiplex.

Amador *et al.* (2009, 2010 e 2011) indicam os isolados CBISA 4253 a 4269 como resistentes à ampicilina. Tendo em conta que em três destes isolados (4253, 4259 e 4268) foi detetada a presença do gene *st*, a resistência a antibióticos torna estas estirpes, potencialmente, ainda mais perigosas para a saúde do consumidor e de mais difícil tratamento em caso de doença.

### 3.4. Ensaio de citotoxicidade

Estes ensaios foram realizados de forma a identificar a presença de estirpes VTEC e estimar o seu potencial de virulência, traduzido pela percentagem de citotoxicidade, com base na medição da LDH libertada, por células Vero, para o meio extracelular.

Foram analisadas as estirpes de *E. coli* (Quadro 1) utilizadas neste trabalho, sendo que como referência para toxina VT foram usadas as estirpes O157:H7 CBISA 4283, 4284 e 4337 e como controlo negativo para a virulência as estirpes CBISA 3034 (XL-1-Blue) e 3965 (*E. coli* B). Através da regressão linear, estabelecida pela curva de calibração (representada no ponto 3.1 - A), determinou-se que a concentração de células bacterianas existentes nas suspensões celulares, a partir das quais se extraíram as toxinas utilizadas nos testes de citotoxicidade, foi de, aproximadamente,  $9 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos encontram-se representados no quadro 10, no que respeita à LDH libertada medida em  $A_{490-650\text{ nm}}$  e em percentagem de citotoxicidade. De forma a facilitar o entendimento dos resultados os dados presentes no quadro 10 foram também representados graficamente (Anexo III).

A análise estatística efetuada, aos resultados de  $A_{490-650\text{ nm}}$ , evidenciou que os dados apresentam efeitos muito significativos entre os níveis do factor ( $p < 0,0001$ , obtido no teste F aos efeitos do fator), o que significa que estamos perante estirpes significativamente diferentes no que respeita à virulência, com base na medição da LDH libertada, em células Vero (considerando  $p \leq 0,05$  como indicador de significância estatística).

Observando os dados do quadro 10 (e o Anexo III), verifica-se, como primeira análise, que as estirpes VTEC de referência (CBISA 4283, 4284 e 4337) bem como os cinco isolados *stx*<sup>+</sup>

(4322, 4323, 4327, 4331 e 4332) induziram uma maior libertação de LDH, em células Vero, do que as estirpes VT negativas ( $p \leq 0,05$ ). Em geral, as estirpes VT-positivas provocaram uma libertação de LDH de 19,9 – 32%, enquanto que as estirpes VT-negativas induziram 4,6 – 9,1% de libertação de LDH. Sendo que, no que respeita às estirpes VT-negativas, os valores mais elevados correspondem a estirpes que embora não-VTEC estão associadas a outros fatores de virulência, nomeadamente à produção das toxinas LT (referência CBISA 4315 e isolados RTE 4321, 4328, 4329 e 4340) e ST (referência CBISA 4316 e isolados RTE 4253, 4259 e 4268), tendo em conta os resultados obtidos em Multiplex PCR (Quadro 10 e Figura 18).

Em análise mais detalhada, tendo em conta apenas os 24 isolados RTE VT-negativos (e aos quais não foram associados outros fatores de virulência) (Quadro 10), observa-se que estes apresentam uma baixa percentagem de citotoxicidade (4,8 a 8,2%), sendo que a maioria das estirpes se aproxima dos 5%, verificando-se apenas quatro estirpes com valores ligeiramente mais elevados (4326 e 4333 – 6%, 4336 – 6,9% e 4360 – 8,2%). Contudo, esta variação não se mostrou estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), tal facto mostra que estes isolados não são significativamente diferentes no que respeita à sua citotoxicidade, considerando a libertação de LDH em células Vero. A mesma apreciação é efetuada quando se comparam estes isolados com as estirpes utilizadas como controlos negativos para a virulência 3034 (*E. coli* XL-1-Blue) e 3956 (*E. coli* B), das quais se obteve uma percentagem de citotoxicidade de 5,1 e 4,6%, respetivamente. Tendo em conta o valor de  $A_{490-650 \text{ nm}}$  medido nestas estirpes pode-se constatar (Quadro 10) que este se situa sempre a baixo dos 0,3, sendo que o isolado que detém o valor mais elevado é o 4360 com  $0,293 \pm 0,033$  (Anexo III).

Tendo em conta as estirpes de referência CBISA 4315 e 4316, usadas como controlo para os genes *lt* e *st*, observa-se que estas não são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre si, no que respeita à virulência (8,8 e 8,7%, respetivamente) (Quadro 10). Dos isolados *lt*<sup>+</sup> (4321, 4328, 4329 e 4340) e *st*<sup>+</sup> (4253, 4259 e 4268), verifica-se que apenas o isolado 4328, é significativamente diferente das estirpes de referência, expressando a percentagem de citotoxicidade mais baixa (6,3%). No entanto, a virulência deste isolado é, aparentemente, a mesma que os isolados 4329 e 4253. Note-se ainda, que o isolado 4321 é significativamente diferente destes três isolados (4328, 4329 e 4253) e que *lhe* está associada a percentagem de citotoxicidade mais elevada (9,1%). Todas estas observações levam à conclusão que as estirpes LT-positivas não são distinguíveis das ST-positivas através da linha celular utilizada (Vero). Pode ser também salientado, que estes valores se assemelham com os obtidos para os isolados aos quais não está associada a presença destes genes (nem dos outros fatores de virulência analisados, quadro 10). Em suma, considera-se que a linha Vero não é adequada para o estudo de estirpes LT ou ST-positivas. Isto deve-se, certamente, à origem renal da linha celular utilizada. De facto as toxinas LT, encontram os seus recetores-alvo nos

gangliósidos GM1 e GD1b, da superfície celular e em algumas glicoproteínas intestinais (Teneberg *et al.*, 1994; Kaper *et al.*, 2004). No caso das toxinas ST, o recetor é a guanilato ciclase C (GC-C), que está localizada na superfície apical da membrana das células epiteliais intestinais (Sauvage *et al.*, 1992; Vaandrager *et al.*, 1994). Ao contrário destas toxinas, as toxinas VT (Stx) ligam-se aos recetores Gb3, muito representativos em células renais (Kaper *et al.*, 2004). Estes estudos seriam complementados e os resultados mais esclarecidos recorrendo, para estas estirpes, a uma posterior avaliação em linhas celulares intestinais, como por exemplo a HT-29 ou Caco-2.

Por último, no que respeita aos cinco isolados VT-positivos (CBISA 4322, 4323, 4327, 4331 e 4332, confirmados por Multiplex PCR) e aos três respetivos controlos 4283, 4284 e 4337, estes mostram-se, como já mencionado, completamente distintos dos restantes ( $p \leq 0,05$ ), com libertações de LDH de 0,482 a 0,676, medida em  $A_{490-650 \text{ nm}}$  e de 19,9 a 32, em percentagem de citotoxicidade (Quadro 10). A estirpe CBISA 4337 (31,6%) não é estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) da estirpe 4283 (32,0%), no que respeita à citotoxicidade em células Vero. Por outro, lado a estirpe 4284 (24,0%), também utilizada como controlo positivo para a toxina VT, revela-se significativamente diferente destas estirpes controlo e de todos os isolados estudados, sendo menos virulenta que os outros dois controlos 4283 e 4337. Considerando os isolados RTE, 4322, 4327 e 4332, estes também se mostram distintos de todos os outros e entre si, com percentagens de citotoxicidade de 19,9; 28,1 e 21,4%, respetivamente. Os isolados 4323 e 4331 são significativamente iguais e diferentes dos restantes isolados, com percentagens de citotoxicidade de 26,0 e 26,9, respetivamente. Estes resultados sugerem heterogeneidade em termos de virulência entre as VTEC que, tal como já mencionado ao longo deste trabalho, acontece normalmente em estirpes VT-positivas. Isto indica que a presença do gene *stx*, por si só, não deve ser considerado como único meio para determinar o potencial de virulência de isolados VT<sup>+</sup>. As mesmas conclusões foram obtidas por Maldonado *et al.* (2005). De um modo geral, as estirpes VT-positivas que apresentaram uma maior citotoxicidade foram duas das três estirpes utilizadas como controlo, 4283 e 4337 (não sendo significativamente diferentes entre si) e a menos virulenta o isolado alimentar 4322. Os valores de citotoxicidade obtidos, para estirpes VT<sup>+</sup>, são mais baixos dos que os referidos nos estudos realizados por Roberts *et al.* (2001), que obtiveram uma percentagem de citotoxicidade de 37-75%. Contudo, estes autores não descrevem todas as condições em que foram realizados os ensaios, nomeadamente o número de células Vero que foi colocada nas microplacas P96, referido apenas que o crescimento inicial da monocamada (sem adição das toxinas) ocorreu em 24 h (tempo que também foi utilizado neste trabalho). A quantidade inicial de células influencia diretamente a quantidade de LDH medida em absorvância, uma vez que estas libertam naturalmente esta enzima ao longo do seu crescimento, sendo que, devido isso, o valor da libertação espontânea deve ser minimizado



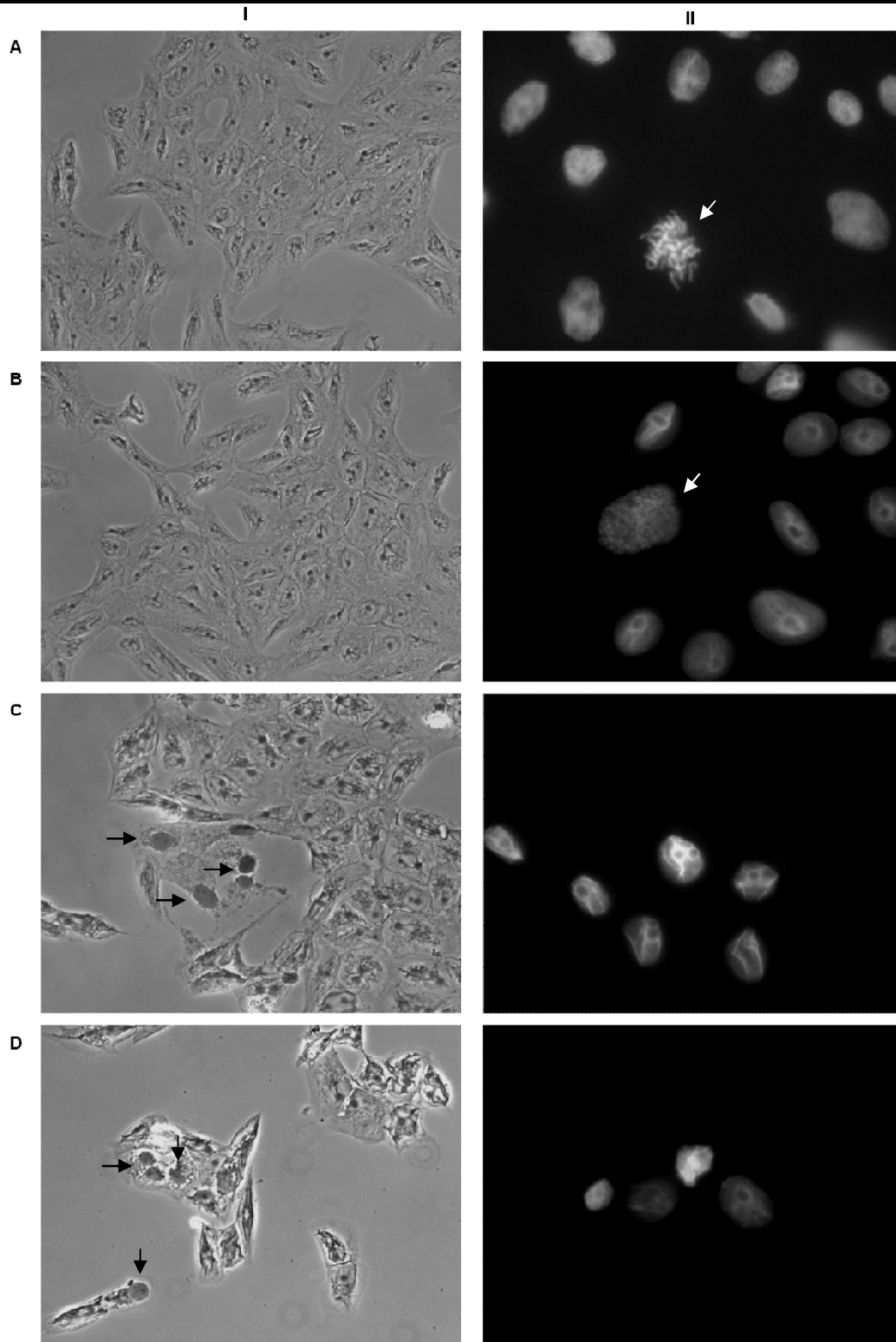
(o que justificou os ensaios preliminares realizados neste trabalho, ver 2.8.1. e 3.1 – B). Igualmente, no mesmo trabalho realizado por Roberts *et al.* (2001), é omissa concentração das suspensões bacterianas a partir das quais se extraíram as toxinas. Deve ainda ser considerado que Roberts *et al.* (2001) mediram a LDH através da absorvância dos valores lidos com o filtro de 490 nm menos os obtidos com 655 nm. No presente trabalho, foi utilizado um filtro de 650 nm em oposição ao de 655 nm, por inexistência do último no Laboratório do ISA. Mas, tal como Roberts *et al.*, (2001) os valores significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mais elevados de libertação de LDH, ocorreram em isolados VT<sup>+</sup>. Considerando Maldonado *et al.* (2005), os valores obtidos, em estirpes VTEC, apresentam uma maior variação. Observando o valor de LDH ( $A_{490 - 655 \text{ nm}}$ ) apresentado para a estirpe ATCC 43895, também utilizada neste trabalho (CBISA 4283) verifica-se que o valor obtido ( $0,68 \pm 0,01$ ) é distinto do obtido para esta estirpe por Maldonado *et al.* (2005) ( $0,53 \pm 0,06$ ). Se considerarmos a percentagem de citotoxicidade calculada para a mesma estirpe, verificamos que esta foi de 68%, enquanto que neste trabalho foi obtido um valor de 32 %. Tal como Roberts *et al.* (2001), em Maldonado *et al.* (2005) são também omissas muitas das condições em que decorreram os ensaios e é utilizado também um filtro de 655 nm. Para além disso, os ensaios são efectuados em microplacas P48 em vez de P96.

Tendo em conta o que já fora mencionado, os valores de percentagem de citotoxicidade obtidos, não são absolutos, uma vez que são calculados com base na libertação de LDH de controlos positivos e negativos, usados em cada ensaio. Um grande número de outros fatores pode ainda ser a causa da variabilidade encontrada nos resultados obtidos por laboratórios distintos.

Os resultados, aqui apresentados, estão de acordo com os obtidos no Multiplex PCR (ponto 3.3) e com a análise fenotípica (ponto 3.2), onde os controlos 4283, 4284 e 4337 e quatro dos isolados RTE considerados VETC (4323, 4327, 4331 e 3232) apresentaram ausência de coloração nas colónias crescidas em CT-SMAC e TBX, indicando que estas estirpes são aparentemente O157:H7 (note-se que a estirpe 4322, embora não-O157:H7, pode expressar outro serótipo VT<sup>+</sup>) (Quadro 10).

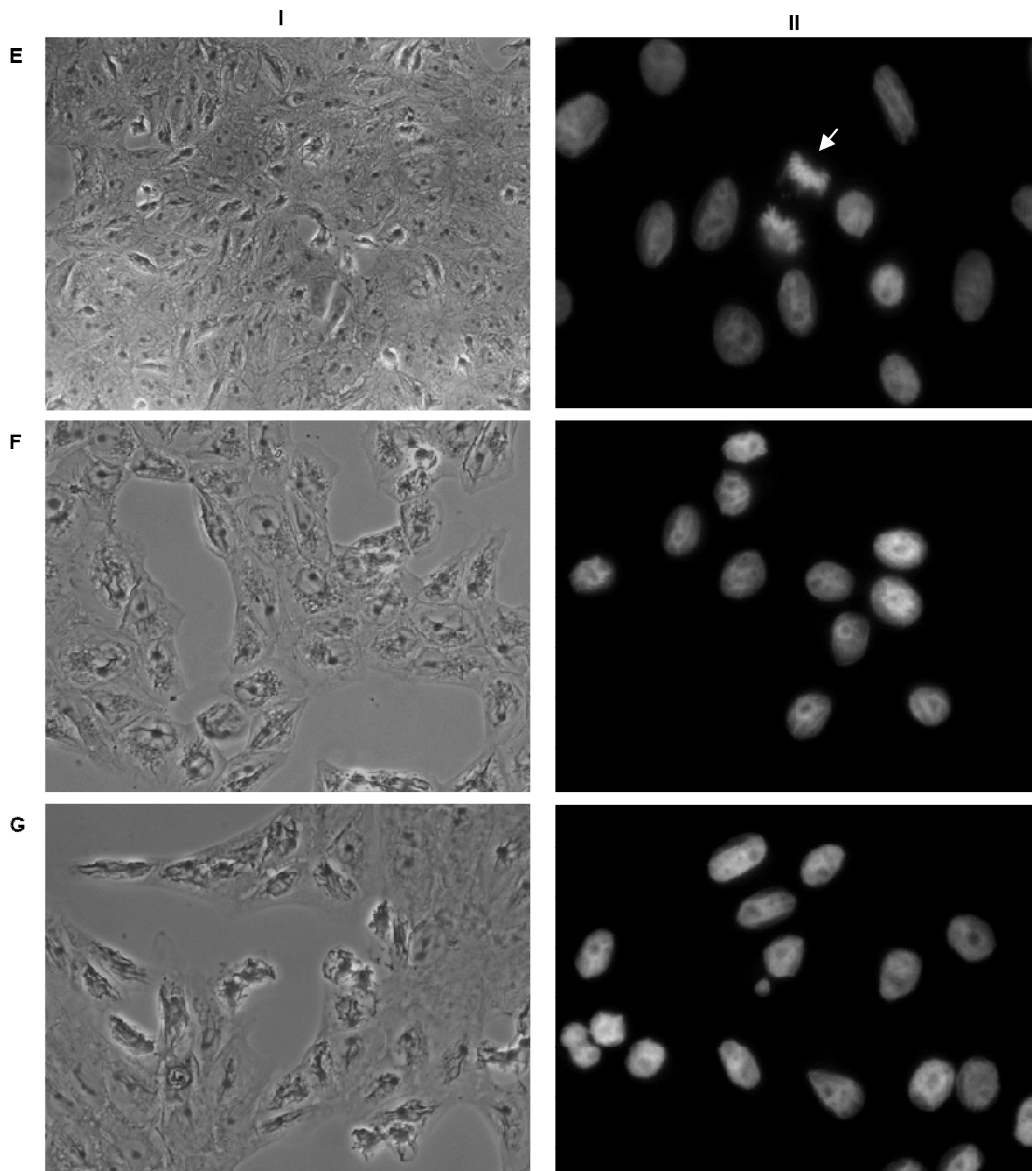
### 3.5. Observação microscópica de efeitos citopáticos

Na figura 19, estão representadas algumas das imagens captadas, relativas ao controlo negativo (células Vero em normal crescimento, sem qualquer contacto com toxinas) e células Vero em contacto com as estirpes CBISA 3965 (*E. coli* B, controlo negativo) para a virulência), 4283 e 4337 (*E. coli* O157:H7, VT<sup>+</sup> e *eae*<sup>+</sup>), 4315 (LT<sup>+</sup> e EAST1<sup>+</sup>) e 4316 (ST<sup>+</sup> e EAST1<sup>+</sup>). Todas as estirpes estudadas foram observadas e comparadas com os controlos.



**Figura 19 – Análise dos efeitos citopáticos causados pelas verotoxinas extraídas das estirpes de *Escherichia coli* em células Vero, em contraste de fase e em coloração de DAPI.**

Os painéis de fotografias encontram-se organizados por colunas: **I** – Observação em contraste de fase (ampliação 200×) e **II** – Observação em coloração de DAPI (ampliação 630×) e por linhas: **A** – Células Vero (controlo), **B** – Células Vero em contacto com a estirpe 3965 (VT), **C** – Células Vero em contacto com a estirpe 4283 (VT<sup>+</sup>). **D** – Células Vero em contacto com a estirpe 4337 (VT<sup>+</sup>). **Seta a branco** – Multiplicação celular (Imagem AII – Metáfase; Imagem BII – Prófase). **Seta a preto** – Células mortas, com aspeto mais denso, arredondadas e azuis (cinzento escuro na imagem).



**Figura 19 (Continuação) – Análise dos efeitos citopáticos causados pelas verotoxinas extraídas das estirpes de *Escherichia coli* em células Vero, em contraste de fase e em coloração de DAPI.**

Os painéis de fotografias encontram-se organizados por colunas: **I** – Observação em contraste de fase (ampliação 200  $\times$ ) e **II** – Observação em coloração de DAPI (ampliação 630 $\times$ ) e por linhas: **E** – Células Vero (Controlo), zona de observação com maior confluência celular em relação à imagem AI, **F** – Células Vero em contacto com a estirpe 4315 (LT<sup>+</sup> e EAST1<sup>+</sup>) e **G** – Células Vero em contacto com a estirpe 4316 (ST<sup>+</sup> e EAST1<sup>+</sup>). **Seta a branco** – Multiplicação celular (EII – Anáfase).

A análise microscópica das células Vero (Figura 19) mostrou que quando estas células são expostas a estirpes não-VTEC (ausência do gene *stx*) não são observados efeitos citopáticos, quando comparadas a células Vero em crescimento normal (sem qualquer contacto com as toxinas produzidas por *E. coli*). Através da figura 19, pode-se verificar, comparando as células Vero em normal crescimento (linhas AI e EI) com as células Vero infectadas com a estirpe 3965 (*E. coli* B, VT<sup>-</sup>), utilizada como controlo negativo para a virulência (linha BI), que, em ambos os casos, as células se apresentam perfeitamente

aderidas à superfície e que o tapete celular se encontra em crescimento normal: monocamada confluyente, composta por células com forma regular, triangular e alongada (morfologia fibroblástica característica das células Vero). A estrutura da membrana citoplasmática encontra-se bem definida, o citoplasma homogéneo (embora com alguma granulação) e não são visíveis células coradas com azul tripano, o que indica que não houve morte celular. Estas características morfológicas estão de acordo com as apontadas por Gonçalves *et al.* (2006) no que respeita ao normal crescimento das células Vero (ensaios controlo), em estudos realizados em contraste de fase. Em relação à coloração de DAPI, observou-se que as células estão em proliferação, confirmada pela visualização de diferentes fases mitóticas. Os núcleos encontram-se em metáfase (AII), prófase (BII) e anáfase (EII), sendo que também foi observada a telófase, nas mesmas condições e nas mesmas estirpes. Os núcleos que não se encontram em divisão revelam uma estrutura normal: encontram-se bem definidos e apresentam uma membrana nuclear aparentemente íntegra, envolvendo o núcleoplasma que parece homogéneo e onde se distinguem perfeitamente os nucleótidos. Todas as características mencionadas, em contraste de fase e em coloração de DAPI, foram observadas não só para a estirpe 3965 (*E. coli* B), como para os 25 isolados, que se revelaram VT-negativos (e também LT, ST, *eae* e EAST1 negativos) por Multiplex PCR (ver o ponto 3.3) e que, conseqüentemente, apresentaram valores baixos de libertação de LDH (4,6 a 8,2% de citotoxicidade) (resultados discutidos no ponto 3.4).

Em oposição a estes isolados, os cinco isolados VT-positivos mostram-se causadores de extensos danos celulares, afetando as características morfológicas e estruturais das células Vero. Na figura 19, linha C e D, pode ser observado o efeito induzido por duas estirpes O157:H7 (4283 e 4337, respetivamente). Na observação microscópica destas estirpes, verificou-se que, em contraste de fase (Figura 19 CI e DI), a maior parte das células eram desagregadas da superfície e morriam (sendo difícil encontrar áreas de observação com células) e que as células que ainda permaneciam aderentes à superfície cresceram muito lentamente e perderam a capacidade de aderir com a confluência normal em monocamada, observada nas imagens AI e EI (Figura 19), que dizem respeito a células Vero em normal crescimento. Tal facto foi também visualizado por Gonçalves *et al.* (2006) após exposição das células Vero ao composto inorgânico cisplatina, usado como agente antineoplásico, e por Hanashima *et al.* (2008) em estudos realizados sobre o efeito do recetor Gb3 na ligação das toxinas VT às células. A presença de efeitos citopáticos pode ainda ser suportada pela visualização de células coradas com azul tripano (setas a preto, figura 19 CI e DI), o que indica a existência de morte celular. Nas células que permaneceram vivas, verificou-se a diminuição do tamanho celular, modificações estruturais na forma característica (forma mais arredondada e irregular), perda da estrutura normal da membrana citoplasmática e

citoplasma mais heterogéneo. Estas alterações são também mencionadas por Nguyen *et al.* (2005), num estudo efetuado sobre os efeitos citopáticos do vírus HSV-1 em células Vero. Nas observações em DAPI, verificou-se a ausência de divisões celulares, em células que ainda se encontravam viáveis, (observando-se para o efeito vários campos microscópicos de cada preparação). A paragem da mitose pode estar relacionada com a presença de stresse celular causado pela ação das verotoxinas sob as células Vero, influenciando o seu normal ciclo de multiplicação. Observou-se que a estrutura normal do núcleo aparecia alterada no que respeita à sua conformação (condensação) e à presença de estrias (Figura 19 CII), o que pode indicar alguma fragmentação dos núcleos. Estas diferenças estruturais nos núcleos foram também observadas por Murugavel *et al.* (2007), em células Vero em contacto com cádmio. Em suma, todas as alterações, em cima mencionadas, provocadas pela ação da toxina VT mostram o seu efeito deletério em células Vero. A estirpe O157:H7, 4284, utilizada como controlo positivo para a citotoxicidade, também demonstrou as mesmas alterações, em contraste de fase e em DAPI, que os outros dois controlos VT<sup>+</sup> (4383 e 4337), assim como os cinco isolados RTE (4322, 4323, 4327, 4331 e 4332), que se revelaram VETC-positivas por Multiplex PCR e que apresentaram uma maior libertação de LDH em células Vero, nos ensaios colorimétricos (Quadro 10).

As mesmas observações relativas a estirpes VT-negativas e VT-positivas, em contraste de fase, foram efetuadas nos estudos realizados por Roberts *et al.* (2001), sendo que estes autores referem ainda a existência de vacuolização, provocada por estirpes VTEC em células Vero. Tal facto foi também observado neste trabalho, embora de forma pouco frequente.

Relativamente às estirpes LT, ST e EAST1 – positivas (Figura 19 F e G), as observações efetuadas mostram que, tal como seria de esperar pelos resultados obtidos no ponto 3.4, não existem muitos efeitos citopáticos visíveis em comparação com as estirpes VTEC, mencionadas anteriormente, e considerando as células Vero em normal crescimento (Figura 19 A e E). Pode-se observar (Figura 19 FI e GI), que as alterações visíveis provocadas pelas estirpes 4315 (LT<sup>+</sup> e EAST1<sup>+</sup>) e 4316 (ST<sup>+</sup> e EAST1<sup>+</sup>) são maioritariamente na estrutura normal da membrana citoplasmática, que em certas zonas do tapete celular é ligeiramente alterada em relação à membrana padrão (Figura 19 AI e EI). Nestes casos, o tapete celular não se desprende da superfície, apresentando uma confluência relativamente idêntica aos controlos negativos, e não foram observadas células coradas com azul tripano, o que indica que estas estirpes não causaram a morte das células Vero. No que respeita à observação em coloração de DAPI, apesar dos núcleos se mostrarem semelhantes aos dos controlos negativos, foram notadas raras divisões celulares (e quando visualizadas, as células apenas se encontravam em prófase ou metáfase). Sete isolados

alimentares RTE (4253, 4259, 4268, 4321, 4328, 4329 e 4340), mostraram-se semelhantes aos controlos para LT e EAST1 (4315) e ST e EAST1 (4316), em ambas as observações. O que também vai de encontro aos resultados obtidos em Multiplex PCR e com a percentagem de LDH libertada pelas células Vero nos ensaios de citotoxicidade, que corresponde a 6,3 - 9,1%, valor semelhante ao determinado para as estirpes VT-negativas e muito menor do que o libertado pelas estirpes VTEC (19,9 – 32%) (Quadro 10).

#### 4. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo principal a implementação de uma nova linha de estudo em *E. coli* no Laboratório de Microbiologia do ISA. Assim, adaptou-se procedimento de Multiplex PCR, utilizado em rotina no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais (no INSA), que deteta a amplificação dos genes *stx*, *lt*, *st*, *astA* e *eae*, responsáveis por codificar as toxinas VT, LT, ST e EAST1 e a proteína intimina respectivamente, e um método que permite a análise da citotoxicidade de isolados de *E. coli*, através da medição da enzima LDH. Simultaneamente, efetuou-se a observação microscópica das estirpes controlo e dos 36 isolados RTE em estudo, por contraste de fase e coloração de DAPI, adaptando estas técnicas ao método citotóxico estabelecido. Este trabalho permitiu, não só o estudo das estirpes utilizadas, como o desenvolvimento de uma nova área de investigação de possível utilização em trabalhos futuros no Laboratório de Microbiologia do ISA.

Os testes fenotípicos realizados previamente permitiram confirmar a pureza de todas as estirpes de referência e isolados de *E. coli* utilizados e, assim, estabelecer uma coleção de trabalho. Esta análise permitiu ainda verificar que quatro dos isolados RTE, apresentaram ausência de coloração nas colónias crescidas em CT-SMAC e TBX, indicando que estas estirpes seriam aparentemente O157:H7, por comparação com os controlos O157:H7 (4283, 4284 e 4337), embora tal facto careça de confirmação serológica ou através de outros métodos imunológicos (como por exemplo os testes ELISA).

O protocolo de Multiplex PCR implementado (com base no procedimento utilizado no INSA) mostrou-se sensível e específico para a deteção dos genes *stx*, *lt*, *st*, *astA* e *eae* pertencentes a estirpes DEC. Em cinco dos 36 isolados RTE, observou-se a presença do gene *stx* (4322, 4323, 4327, 4331 e 4332), num o gene *eae* (4232), em quatro o gene *lt* (4321, 4328, 4329 e 4340) e em três o gene *st* (4253, 4259 e 4268). Nenhum dos isolados mostrou amplificação para o gene *astA*. Quatro dos cinco isolados VTEC tiveram um comportamento, em meios diferenciais, semelhante às estirpes de referência (O157:H7). O isolado 4322, aparentemente, parece não pertencer a este serótipo, o que não implica que não seja de outro serótipo produtor de verotoxinas. Assim sendo, cinco isolados comportam-se como estirpes VTEC (*stx* positivos) e sete como ETEC (*lt* e *st* positivos).

Os resultados relativos aos ensaios de citotoxicidade, com base na medição da LDH, validaram os resultados obtidos por Multiplex PCR e pela utilização de meios diferenciais. Verificou-se que oito dos isolados RTE e estirpes controlo *stx*<sup>+</sup> (4283, 4284, 4337, 4322, 4323, 4327, 4331 e 4332) induziram a uma maior libertação ( $p \leq 0,05$ ), de LDH por células Vero (19,9 – 32%), do que os VT-negativos (4,6 – 9,1%). Os valores mais elevados, medidos para as estirpes VT-negativas, corresponderam maioritariamente a estirpes que

estão associadas a outros fatores de virulência, nomeadamente à produção das toxinas LT, ST e EAST1. Contudo, mesmo tendo em conta que estas estirpes se mostram significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) dos controlos negativos, os valores de LDH medidos não são muito distintos dos obtidos para os restantes isolados, que não foram associados a nenhum fator de virulência.

A análise microscópica das células Vero, em contraste de fase e em coloração de DAPI, revelou as estirpes VT-negativas não provocam efeitos citopáticos visíveis quando comparadas a células Vero em crescimento normal. As células permaneceram saudáveis e a proliferar, observando-se várias fases mitóticas. No que respeita às estirpes LT, ST e EAST1 positivas o tapete celular não foi desprendido da superfície, apresentando uma confluência relativamente idêntica à observada nos controlos negativos, não foram observadas células coradas com azul tripiano e os núcleos permaneceram quase inalterados e em divisão, embora que mais raramente observada. Em oposição às estirpes referidas anteriormente, as estirpes VT-positivas mostram-se causadoras de extensos danos celulares em células Vero, afetando as suas características morfológicas e estruturais, entre as quais a sua desagregação da superfície, perda da capacidade de aderir confluentemente em monocamada, diminuição do tamanho celular, perda da forma característica, paragem da mitose, alterações nucleares e morte.

Considera-se que os ensaios de citotoxicidade efetuados, de medição de LDH e de observação microscópica, em células Vero são eficazes na deteção da virulência associada a estirpes VTEC. Todavia, apresentam limitações caso se pretenda avaliar estirpes que embora não-VTEC estejam associadas a outros fatores de virulência, nomeadamente a produção das enterotoxinas ST, LT e EAST1. Isto deve-se, possivelmente, à ausência de recetores específicos para estas toxinas em células provenientes dos rins, uma vez que estas se ligam habitualmente, em ambos os casos, a recetores intestinais (gangliósdeos GM1 e GD1b da superfície celular e a algumas glicoproteínas intestinais, no caso das toxinas LT ou à guanilato ciclase C (GC-C), nas toxinas ST). Considera-se que, estes estudos seriam complementados e os resultados mais esclarecidos recorrendo, para estas estirpes, a uma posterior avaliação em linhas celulares intestinais, como por exemplo HT-29 ou Caco-2.

Em suma, como ensaio de rotina, para isolados de *E. coli* potencialmente patogénicos deve ser efetuado, em primeira análise, o Multiplex PCR, uma vez que se trata de uma técnica rápida, sensível e de fácil aplicação. Sendo que poderá ser utilizado o protocolo implementado, ou outro mais completo, onde se inserisse a pesquisa de mais genes que codificam outros fatores de virulência, tais como o gene *ehxA* que codifica a toxina enterohemolisina (*hlyA*) em estirpes O157, que está associada a doenças de maior severidade provocadas por EHEC (VT-positivas); o gene *daaE* que codifica a fímbria F1845



em estirpes DAEC, que induz o efeito citopático de transdução de sinal nos enterócitos do intestino delgado, que se manifesta com o crescimento de longas extensões celulares (*finger-like cellular projections*), em torno das bactérias aderentes; e o gene *ial* (*invasion associated locus*), que proporciona às estirpes EIEC a possibilidade de invadirem as células intestinais, aumentando assim a sua patogenicidade.

Se a análise por Multiplex PCR originar resultados positivos para qualquer um destes genes, deverá passar-se, caso se pretenda uma análise mais detalhada, para os ensaios de citotoxicidade. Esta análise poderá ser feita através do método adaptado, em células Vero, para o estudo de isolados VT-positivos ou, nos isolados associados a outros fatores de virulência, a linhas celulares mais adequadas (como por exemplo linhas celulares intestinais). A análise da citotoxicidade é importante para avaliar o efeito da presença de determinado gene virulento sobre as células do hospedeiro, uma vez que a presença de um gene não garante a produção da toxina. Além disso, a heterogeneidade na citotoxicidade de isolados VT, será mais esclarecida com estes ensaios. A análise microscópica revela-se como uma ferramenta útil que pode ser utilizada, por exemplo, na investigação de resultados discordantes entre o Multiplex PCR e a medição da LDH.

Embora, aparentemente, o enorme volume de produção científica que existe sobre *E. coli* possa suportar a ideia de que se sabe tudo sobre este microrganismo, a verdade é que os trabalhos efetuados servem para provar que, de facto, possuímos um conhecimento ainda limitado sobre determinados patótipos, principalmente de estirpes selvagens, que se adaptam a nichos específicos. Este facto é preocupante para a Indústria Alimentar, que tem que garantir a segurança dos seus produtos. Isto pode ser sustentado pelo aparecimento cada vez mais rotineiro de surtos de *E. coli* associados a alimentos, como por exemplo o que se originou na Alemanha em 2011 (Bielaszewaka *et al.*, 2011; WHO, 2011; Tzschoppe *et al.*, 2012).

Assim, considera-se que os estudos sobre *E. coli* devem ser continuados e que a Indústria Alimentar deve estar cada vez mais consciente dos perigos que *E. coli* representa, uma vez que a presença destes patótipos em alimentos, principalmente RTE, põe em causa a saúde do consumidor, implementando todas as regulamentações e metodologias necessárias para a sua prevenção e erradicação.

São várias as perspetivas futuras possíveis no decurso deste trabalho, entre as quais se indica a realização de ensaios em linhas celulares intestinais, de forma a analisar a virulência das toxinas LT, ST e EAST1, destacando-se a linha HT-29, existente no Laboratório de Microbiologia do ISA; o alargamento do estudo do efeito de probióticos, já em curso no ISA, aos ensaios de citotoxicidade usando a linha celular Vero; avaliação da

capacidade de formação de biofilme das estirpes de *E. coli* estudadas; a sua resistência a antibióticos e a análise de outros factores de virulência, entre outros.

## 5. Referências Bibliográficas

- Adam, T., Arpin, M., Prévost, M.C., Gounon, P. e Sansonetti, P.J. (1995). Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *The Journal of Cell Biology*. **129**: 367-381.
- Adams, M.R., Grubb, S.M., Hamer, A. e Clifford, M.N. (1990). Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on b-glucuronidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **56(7)**: 2021-2024.
- Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Gonçalves, A.G., Trabulsi, L.R., Douce, G., Knutton, S., Dougan, G. (1998). Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimina derivative expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 662-668;
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4ªEdição. Garland Science. EUA.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. e Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. **25**: 3389-3402.
- Amador, P., Fernandes, R., Brito, L., Prudêncio, C. (2011). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae isolated from Portuguese deli meats. *Journal of Food Safety*. **31**: 1-20.
- Amador, P., Fernandes, R., Duarte, I., Brito, L. e Prudêncio, C. (2010). In vitro transference and molecular characterization of *bla*<sub>TEM</sub> genes in bacteria isolated from Portuguese ready-to-eat foods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **27**: 1775-1785 (11).
- Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C., Brito, L. (2009). Resistance to b-lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese cheese. *International Journal of Molecular Sciences*. **10(4)**: 1538-1551.
- Anang, D.M., Rusul, G., Jamilah, B., Foo, H.L. (2007). Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored a 4 °C. *Food Control*. **18**: 961-969.
- Andreoli, S.P., Trachtman, H., Acheson, D.W., Siegler, R.L. e Obrig, T.G. (2002). Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatric Nephrology*. **17**: 293-298.

- Arocha, M.M., McVey, M., Loder, S.D., Rupnow, J.H. e Bullerman, L. (1992). Behavior of hemonhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *Journal of Food Protection*. **55**: 379-381.
- Badri, S., Filliol, I., Carle, I., Hassar, M., Fassouane, A. e Cohen, N. (2009). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from food in Casablanca (Marocco). *Food Control*. **20**: 560-564.
- Bai, J., Shi, X. e Nagaraja, T.G. (2010). A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods*. **82**: 85-89.
- Baldini, M.M., Kaper, J.B., Levine, M.M., Candy, D.C. e Moon, H.W. (1983). Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. **2**: 534-538.
- Baqui, A.H., Sack, R.B., Black, R.E., Haider, K., Hossain, A., Alim, A.R., Yunus, M., Chowdhury, H.R. e Siddique, A.K. (1992). Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *The Journal of Infectious Diseases*. **166**: 792-796.
- Bastian, S.N., Carle, I. e Grimont, F. (1998). Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Research microbiology*. **149**: 457-472.
- Bauer, M.E. e Welch, R.A. (1996). Characterization of an RTX toxin from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*. **64**: 167-175.
- Betis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Bernet-Camard, M.F., Rossi, B., Servin, A. e Hofman, P. (2003). The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infection and Immunity*. **71**: 1068-1074.
- Bettelheim, K.A. e Beutin, L. (2003). Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *Journal of Applied Microbiology*. **95**: 205-217.
- Bhagwat, A.A. (2003). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, listeria monocytogenes and salmonella strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. **84**: 217-224.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G. e Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an

- outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet*. **11**: 671-676.
- Bilge, S.S., Apostol, J.M., Jr., Aldape, A. e Moseley, S.L. (1993). mRNA processing independent of RNase III and RNase E in the expression of the F1845 fimbrial adhesion of *Escherichia coli*. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **98**: 1455-1459.
- Bilge, S.S., Clausen, C.R., Lau, W. e Moseley, S.L. (1989). Molecular characterization of a fimbrial adhesion, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Journal of Bacteriology*. **171**: 4281-4289.
- Biokar Diagnostics. (2009a). *Macconkey Sorbitol Agar (CT-SMAC)*. Acedido a 17 de Agosto de 2011, em: [http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produtsDiagnostic.nsf/0/27DFE62DDA44AF3AC12574C7003A6377/\\$file/TDS\\_BK147\\_v5.pdf](http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produtsDiagnostic.nsf/0/27DFE62DDA44AF3AC12574C7003A6377/$file/TDS_BK147_v5.pdf).
- Biokar Diagnostics. (2009b). *TBX Agar*. Acedido a 17 de Agosto de 2011, em: [http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produtsDiagnostic.nsf/0/C79DF52317778F70C12574C700383D89/\\$file/TDS\\_BK146\\_BM069\\_v7.pdf](http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produtsDiagnostic.nsf/0/C79DF52317778F70C12574C700383D89/$file/TDS_BK146_BM069_v7.pdf).
- Biotium. (2008). *Safety Report of GelRed and GelGreen*. Nucleic Acid Detection Technologies. Ficha técnica do produto.
- Blais, B.W., Bosley, J., Martinez-Perez, A. e Popela, M. (2006). Polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* O111 and O26. *Journal of Microbiological Methods*. **65**: 468 – 475.
- Blanco, M. Podola, N.L., Krüger, A., Sanz, M.E., Blanco, J.E., González, E.A., Dhahi, G., Mora, A., Bernárdez, M.I., Etcheverria, A.L., Arroyo, G.H., Lucchesi, P.M.A., Parma, A.E., Blanco, J. (2004b). Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*. **7**: 269–276.
- Blanco, M., Blanco, J.E., González, E.A., Mora, A., Jasen, W., Gomes, T.A., Zerbini, L.F., Yano, T., de Castro, A.F. e Blanco, J. (1997). Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxin phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 2958-2963.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dhahi, G., Alonso, M.P., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J. (2004a). Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin

- (verotoxina)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain identification of a new intimina variante gene (eae-ξ). *Journal of Clinical Microbiology*. **42**: 645-651;
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J.M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M.P., Dahbi, G., González, E.A., Bernárdez, M.I. e Blanco, J. (2003). Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**: 1351-1356.
- Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J.E., Dhabi, G., Blanco, J., Stephan, R. (2005). Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-η2). *BMC Microbiology*. **5**: 23.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P. e Gyles, C.L. (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 497-503.
- Brian, M.J., Frosolono, M., Murray, B.E., Miranda, A, Lopez, E.L., Gomez, H.F. e Cleary, T.G. (1992). Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**: 1801-1806.
- Buchanan, R.L. e Doyle, M.P. (1997). Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli*. *Food Techonology*. **51**: 69-76.
- Buchrieser, C., Glaser, P., Christophe, R., Nedjari, H., d'Hauteville, H., Kunst, F., Sansonetti, P. e Parsot, C. (2000). The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*. **38**: 760-771.
- CAC, Codex Alimentarius Commission. (2003). *Risk profile for enterohemorrhagic E. coli including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and pork*. Codex Committee on Food Hygiene. Food and Agriculture Organization of the United Nations e World Health Organization. Acedido em 12 de Fevereiro de 2012, em: <ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh35/fh0305de.pdf>.
- Call, D., Brockman, F.J. e Chandler, D.P. (2001). Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Environmental Microbiology*. **67**: 71-80.

- Campos, L.C., Franzolin, M.R. e Trabulsi, L.R. (2004). Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **99**: 545-552.
- Canizalez-Roman, A. e Navarro-Garcia, F. (2003). Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. *Molecular Microbiology*. **48**: 947-958.
- Cassels, F.J. e Wolf, M.K. (1995). Colonization factors of diarrhoeagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **15**: 214-226.
- Chao, K.L. e Dreyfus, L.A. (1997). Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*. **65**: 3209-3217.
- Chapman, P.A., Cerdán Malo, A.T., Ellin, M., Ashton, R. e Harkin. (2001). *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yourshire, UK. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 139-150.
- Chen, H.D. e Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. **29**: 83-98.
- Chen, S., Zhao, S., McDermott, P.F., Schroder, C.M., White, D.G. e Meng, J. (2005). A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in salmonella serovars and *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Probes*. **19**: 195-201.
- China, B., Goffaux, F., Pirson, V., Mainil, J. (1999a). Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters*. **178**: 177-182;
- China, B., Jacquemin, E., Devrin, A.C., Pirson, V. e Mainil, J. (1999b). Heterogeneity of *eae* genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison whit human strains. *Research in Microbiology*. **150**: 323-332;
- Chizhikov, V., Rasooly, A. Chumakov, K. e Levy, D.D. (2001). Microarray analysis of microbial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 3258-3263.
- Conner, D.E. e Kotrola, J.S. (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 382-385.

- Cookson, S. e Nataro, J.P. (1996). Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microbiol Pathogenesis*. **21**: 421-434.
- Crane, J.K., McNamara, B.P. e Donnenberg, M.S. (2001). Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. **3**: 197-211.
- Crane, J.K., Wehner, M.S., Bolen, E.J., Sando, J.J., Linden, J., Guerrant, R.L. e Sears, C.L. (1992). Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) and protein kinase C. *Infection and Immunity*. **60**: 5004-5012.
- Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L. e Smith, C.E. (1992). Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *PNAS*. **89**: 947-951.
- Czeczulin, J.R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M.H., Navarro-Garcia, F. e Nataro, J.P. (1997). Aggregative adherence fimbriae II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. **65**: 4135-4145.
- De Boer, E. e Heuvelink, A.E. (2000). Methods for the detection and isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Symposium Series Society for Applied Microbiology*. **29**: 133S-143S.
- Devasia, R.A., Jones, T.F, Ward, J. Stafford, L., Hardin, H., Bopp, C., Beatty, M., Mintz, E. e Schaffner, W. (2006). Endemically acquired foodborne outbreak of enterotoxigenic-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. *The American Journal of Medicine*. **119**: 168.e7-168.e10.
- Dong, Y., Glasner, J.D., Blattner, F.R. e Triplett, E.W. (2001). Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 open reading frames. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 1911-1921.
- Donlan, R. e Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**: 167-193.
- Donnenberg, M.S. e Whittam, T.S. (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*. **107**: 539-548.
- Donnenberg, M.S., Tacket, C.O., James, S.P., Losonsky, G., Nataro, J.P., Wasserman, S.S., Kaper, J.B. e Levine, M.M. (1993). Role of the eaeA gene in experimental



- enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *The Journal of Clinical Investigation*. **92**: 1412-1417.
- Drasar, B.S. e Hill, M.J. (1974). *Human intestinal flora*. Academic Press. Londres. Reino Unido. p: 36-43.
- Dreyfus, L.A., Harville, B., Howard, E., Shaban, R., Beatty, D.M. e Morris S.J. (1993). Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **90**: 3202-3206.
- Dulbecco, R. e Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*. **8**: 396-397.
- Dupont, H.L., Formal, S.B., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P., Sheahan, D.G., LaBrec, E.H. e Kalas, J.P. (1971). Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *The New England Journal of Medicine*. **285**: 1-9.
- Durso, L.M., Bono, J.L. e Keen, J.E. (2007). Molecular serotyping of *Escherichia coli* O111:H8. *Journal of Microbiological Methods*. **69**: 381-383.
- Edwards, P.R. e Ewing, W.H. (1972). *Identification of Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co. Minneapolis. EUA.
- Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J. e Carlier, M.F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial action-based motility. *Journal of Cell Biology*. **146**: 1319-1332.
- El-Hadedy, D. e El-Nour, S.A. (2012). Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Eppinger, M., Mammel, M.K., Leclerc, J.E., Ravel, J. e Cebula, T.A. (2011). Genomic anatomy of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **108 (50)**: 20142-20147.
- Erlich, H.A. (1989). *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press. EUA.
- FAO e OMS. (2009). *Risk characterization of microbiological hazards in food*. Acedido a 20 de Março de 2011 em: [www.fao.org/docrep/012/i1134e/i1134e.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i1134e/i1134e.pdf).
- Farmer, J.J. e Davis, B.R. (1985). H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*. **22**: 620-625.

- Ferreira, W.F.C e Sousa, J.C.F. (2000). *Microbiologia*. Volume 2. Lidel. Lisboa. **p:** 10-102.
- Francis, D.H. (2002). Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and it diagnosis. *Journal of Swine Health and Production*. **10**: 171-175.
- Frankel, G. Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B. e Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*. **30**: 911-921.
- Frankel, G., Phillips, A.D., Trabulsi, L.R., Knutton, S., Dougan, G. e Matthews, S. (2001). Intimin and the host cell – is it bound to end in Tir(s)? *Trends in Microbiology*. **9**: 214-218.
- Frankel, G., Riley, L. Giron, J.A., Valmassoi, J., Friedmann, A., Strockbine, N., Falko, S. e Schoolnik, G.K. (1990). Detection of *Shigella* in faces using DNA amplification. *The Journal of Infectious Diseases*. **161**: 1252-1256.
- Fratamico, P.M., Sackitey, S.K., Wiedmann, M. e Deng, M.Y. (1995). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**: 2188-2191.
- FSA e ECDC. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. **10**(3): 2597.
- Fujisawa, T., Sata, S., Aikawa, K., Takahashi, T., Yamai, S. e Shimada, T. (2002). Evaluation of sorbitol-salicin MacConkey medium containing cefixime and tellurite (CT-SSMAC medium) for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from raw vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. **74**: 161-163.
- Garabal, J.I., González, E.A., Vázquez, F., Blanco, J., Blanco, M. e Blanco, J.E. (1996). Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Veterinary Microbiology*. **48**: 113-123.
- Garmendia, J., Frankel, G. e Crepin, V.F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*. **73**: 2573-2585.
- Garrido, P., Blanco, M., Moreno-Paz, M., Briones, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Parro, V. (2006). STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clinical Chemistry*. **52**: 192– 201.

- Ge, B., Zhao, S., Hall, R. e Meng, J. (2002). A PCR-ELISA for detecting shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*. **4**: 285-290.
- Gelting, R.J., Baloch, M.A.m Zarate-Bermudez, M.A. e Semnan, C. (2011). Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach. *Agricultural Water Management*. **98**: 1395-1402.
- Getty, K.J.K., Phebus, R.K., Marsden, J.L., Fung, D.Y.C. e Kastner, C.L. (2000). *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. **8**: 141-170.
- Gilbert, R.J., Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C.D., Richards, J., Roberts, D. e Bolton, F.J. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. PHLS Advisory Committee for Food and Dairy Products. *Commun Dis Public Health*. **3**: 163-167.
- Girón, J.A., Donnenberg, M.S., Martin, W.C., Jarvis, K.G. e Kaper, J.B. (1993). Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*. **168**: 1037-1041.
- Girón, J.A., Ho, A.S.Y e Schoolnik, G.K. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. **254**: 710-713.
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. e Doyle, M.P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 2513-2516.
- Goldberg, M.B. e Sansonetti, P.J. (1993). *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infection and Immunity*. **61**: 4941-4946.
- Goldberg, M.B., Barzu, O., Parsot, C. e Sansonetti, P.J. (1993). Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. *Journal of Bacteriology*. **175**: 2189-2196.
- Gonçalves, E.M., Ventura, C.A., Yano, T., Macedo, M.L.R. e Genari. (2006). Morphological and growth alterations in Vero cells transformed by cisplatin. *Cell Biology International*. **30**: 485-494.
- Goodson, M. e Rowbury, R.J. (1989). Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. *Letters in Applied Microbiology*. **8**: 77-79.

- Goosney, D., DeVinney, R., Pfuetzner, R., Frey, E., Strynadka, N.C. e Finlay, B.B. (2000). Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actin. *Current Biology*. **10**: 735-738.
- Graaf, F.K. e Gaastra, W. (1994). *Fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli*. Edição Klemm, P., em *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. 1ª Edição. CRC Press. Boca Raton. Florida. p: 58-83.
- Grant, J., Wendelboe, A.M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C. e Rolfs, R.T. (2008). Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak, Utah and New México, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. **14**: 1633-1636.
- Gray, L.D. (1995). *Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia. Manual of Clinical Microbiology*. Edição Murray, P.R. ASM Press. Washington. p: 450-456.
- Hales, B.A., Hart, C.A., Batt, R.M. e Saunders, J.R. (1992). The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. *Plasmid*. **28**: 183-193.
- Hanashima, T., Miyake, M., Yahiro, K., Iwamaru, Y., Ando, A., Morinaga, N. e Noda, M. (2008). Effect of Gb3 in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of mutant Vero cells. *Microbial Pathogenesis*. **45**: 124-133.
- Hansan, R. J., Pawelczyk, E., Urvil, P.T., Venkatarajan, M.S., Goluszko, P., Kur, J., Selvarangan, R., Nowicki, S., Braun, W.A. e Nowicki, B.J. (2002). Structure-function analysis of decay-accelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesion and complement regulation. *Infection and Immunity*. **70**: 4485-4493.
- Harris, J.R., Wachsmuth, I.K., Davis, B.R. e Cohen, M.L. (1982). High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infection and Immunity*. **37**: 1295-1298.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R. Vance, G.H. e Vogt, P.H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*. **23**: 504-511.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. **23**: 504-511.
- Hill, W.E. (1996). The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **36**: 123-173.
- Hora, V.P., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., Doolan, D.L. (2011). Non-toxic derivatives of LT as potente adjuvants. *Vaccine*. **29**: 15381544.

- Ismaili, A., Philpott, D.J., Dytoc, M.T. e Sherman, P.M. (1995). Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. **63**: 3316-3326.
- Jackson, M.P., Neill, R.J., O'Brien, A.D., Holmes, R.K. e Newland, J.W. (1987). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters*. **44**: 109-114.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. e Kaper, J.B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *PNAS*. **87**: 7839-7843.
- Jo, M., Kim, J., Lim, J., Kang, M., Koh, H., Park, Y., Yoon, D., Chae, J., Eo, S. e Lee, J.H. (2004). Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *International Journal of Food Microbiology*. **95**: 41-49.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. e Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Microbiology Reviews*. **2**: 123-140.
- Karmali, M.A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. **2**: 15-38.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. e Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*. **91**: 511-520.
- Keskimaki, M., Ekulund, M., Pesonen, H., Heiskanen, T. e Siitonen, A. (2001). EPEC, EAEC e STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **40**: 151-156.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., Botstein, D., Brown, P.O. e Yanosfsky, C. (2000). DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **97**: 12170-12175.
- Kim, K.H., Cho, J.I., Cheung, C.Y., Lim, J.M., Cho, S., Cho, D.H., Kang, C.S. e Kim, D.H. (2010). Development of a Multiplex PCR assays to identify *Escherichia coli* pathogenic genes in food. *Food Science and Biotechnology*. **19**(5): 1205-1210.
- Klapproth, J.M., Sonnenberg, M.S., Abraham, J.M. e James, S.P. (1996). Products of enteropathogenic *E. coli* inhibit lymphokine production by gastrointestinal lymphocytes. *American Journal of Physiology*. **271**: 841-848.

- Klapproth, J.M.A., Scaletsky, C.A., McNamara, B.P. Lai, L.C., Malstrom, C., James, S.P e Donnenberg, M.S. (2000). A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infection and Immunity*. **68**: 2148-2155.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H. e McNeish. (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. **57**: 1290-1298.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I. e Stavric S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. **18**: 775-779.
- Kuhnert, P., Boerlin, P. e Frey, J. (2000). Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**: 107-117.
- Kulasekara, B.R., Jacobs, M., Zhou, Y., Wu, Z., Sims, E., Saenphimmachak, C., Rohmer, L., Ritchie, J.M., Radey, M., McKevitt, M., Freeman, T.L., Hayden, H., Haugen, E., Gillett, W., Fong, C., Chang, J., Beskhlebnaya, V., Waldor, M.K., Samadpour, M., Whittam, T.S., Kaul, R., Brittnacher, M. e Miller, S.I. (2009). Analysis of the genome of the *Escherichia coli* O157:H7 2006 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence. *Infection and Immunity*. **77**: 3713-3721.
- Lacasse, D. (1995). *Introdução à microbiologia alimentar*. Instituto Piaget. Ciência e Técnica. Lisboa.
- Lan, R., Alles, M.C., Donohoe, K., Martinez, M.B. e Reeves, P.R. (2004). Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infection and Immunity*. **72**: 5080-5088.
- Le Bouguenec, C. e Servin, A.L. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesions (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. **256**: 185-194.
- Levine, M.M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *The Journal of Infectious Diseases*. **155**: 377-389.
- Levine, M.M., Caplan, E.S., Watermann, D., Cash, R.A., Hornick, R.B. e Snyder, M.J. (1977). Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity*. **17**: 78-82.

- Levine, M.M., Ristaino, P., Marley, G., Smyth, C., Knutton, S., Boedeker, E., Black, R., Young, C., Clements, M.L., Cheney, C. e Patnaik, R. (1984). Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. *Infection and Immunity*. **44**: 409-420.
- Liao, T.T., Shi, Y.L., Jia, J.W., Jia, R.W. e Wang, L. (2010). Sensitivity of morphological change of Vero cells exposed to lipophilic compounds and its mechanism. *Journal of Hazardous Materials*. **179**: 1055-1064.
- Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N. e Foster, J.W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 3094-3100.
- Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S., e Karmali, M. (1987). Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**: 8834-8839.
- Lior, H. (1994). *Classification of Escherichia coli*. Edição Gyles, C.L., em *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB Internacional. Wallingford. Reino Unido. **p**: 31-72.
- Livak, K.J, e Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. **25**: 402-408.
- Louie, M., Azavedo, J.D., Clarke, R., Borczyk, A., Lior, H., Richter, M., Brunton, J. (1994). Sequence heterogeneity of the *eae*-gene and detection of verotoxin producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Journal of Infection*. **112**: 449 - 461.
- Louise, C.B. e Obrig, T.G. (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*. **172**: 1397-1401.
- Madigan, M.T. e Martinko, J.M. (2006). *Biology of microorganisms*. 11ª Edição. Pearson Education International. EUA.
- Mainil, J.G. e Daube, G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 1332-1344.
- Maldonado, Y., Fiser, J.C., Nakatsu, C.H. e Bhunia, A.K. (2005). Cytotoxicity potential and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from environmental and food sources. *Applied and environmental microbiology*. **71**: 1890-1898.

- Malstrom, C. e James, S. (1998). Inhibition of murine splenic and mucosal lymphocyte function by enteric bacterial products. *Infection and Immunity*. **66**: 3120-3127.
- Manning, S.D., Motiwala, A.S., Springman, A.C., Qi, W., Lacher, D.W., Ouellette, L.M., Mladonicky, J.M., Somsel, P., Rudrik, J.T., Dietrich, S.E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D. e Whittan, T.S. (2008). Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *PNAS*. **105**: 4868-4873.
- Marier, R., Wells, J.G., Swanson, R.C., Dallhan, W. e Mehlman I.J. (1973). An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported french cheese. *The Lancet*. **302**: 1376-1378.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S. e Karper, J.B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **92**: 1664-1668.
- Menard, L.P. e Dubreuil, J.D. (2002). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Critical Reviews in Microbiology*. **28**: 43-60.
- Meng, J., Zhao, S., Doyle, M.P., Mitchell, S.E. e Kresovich, S. (1996). Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. **32**: 103-113.
- Millard, G. e Rockliff, S. (2003). Microbiological quality of ready-to-eat foods. ATC – Australian Capital Territory Department of Health. *Act Health Protection Service*. 1-8.
- Miller, L.G. e Kaspar, C.W. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection*. **57**: 460-464.
- Milon, A. (1993). Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *E. coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal. *Revue de Medecine Veterinaire*. **144**: 857-878.
- Montet, M.P., Christieans, S., Thevenot, D., Coppet, V., Ganet, S., Muller, M.L.D, Dunière, L., Miszczycha, S. e Vernozy-Rozand, C. (2009). Fate of acid-resistant and non-acid resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in experimentally contaminated French fermented raw meat sausages. *International Journal of Food Microbiology*. **129**: 264-270.
- Moreira, C.G., Palmer, K., Whiteley, M., Sircili, M.P., Trabulsi, L.R., Castro, A.F.P. e Sperandio, V. (2006). Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **188**: 3952-3961.



- Murugavel, P., Pari, L., Sitasawad, S.L., Kumar, S. e Kumar, S. (2007). Cadmiun induced mitochondrial injury and apoptosis in vero cells: protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **39**: 161-170.
- Muza-Moons, M.M., Koutsouris, A. e Hecht, G.(2003). Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infection and Immunity*. **71**: 7069-7078.
- Nagy, B. e Fekete, P.Z. (1999). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research*. **30**: 259-284.
- Nair, G.B. e Takeda, Y. (1998). The heat-stable enterotoxins. *Microbiol Pathogenesis*. **24**: 123-131.
- Nataro, J.K. Bopp, C.A., Fields, P.I., Kaper, J.B. e Strockbine, N.A. (2007). *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. Edição Murray, P.R.. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington. **p**: 670-687.
- Nataro, J.P. e Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. **11**: 142-201.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Cookson, S., Cravioto, A., Savarino, S.J., Guers, L.D., Levine, M.M. e Tacket, C.O. (1995). Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *Journal of Infectious Diseases*. **171**: 465-468.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Maneval, D.R., German, A.L., Martin, W.C. e Levine, M.M. (1992). Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and Immunity*. **60**: 2297-2304.
- Nataro, J.P., Maher, K.O., Mackie, P. e Kaper, J.B. (1987). Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. **55**: 2370-2377.
- Nataro, J.P., Steiner, T.S. e Guerrant, R.L. (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infecctious Diseases*. **4**: 251-261.
- Navarro-Garcia, F., Eslava, C., Villaseca, J.M., López-Revilla, R., Czezulín, J.R., Srinivas, S., Nataro, J.P. e Cravioto, A. (1998). In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. **66**: 3149-3154.
- NCBI. (2011). *BLAST<sup>0</sup> Assembled RefSeq Genemoes*. Acedido a 20 de Dezembro de 2011, em: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

- Neves, E. (2009). *Tipagem molecular e avaliação do potencial patogénico de Listeria monocytogenes*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. **p:** 61.
- Newsholme, P. (2001). Why is L-glutamine metabolism important to cells of immune system in health, postinjury, surgery or infection?. *Journal of Nutrition*. **131**: 2515S-2522S.
- Nguyen, M.L., Kraft, R.M. e Blaho, J.A. (2005). African green monkey kidney Vero cells require de novo protein synthesis for efficient herpes simplex virus 1 – dependent apoptosis. *Virology*. **336**: 274-290.
- Nicholls, L., Grant, T.H. e Robins-Browne, R.M. (2000). Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Molecular Microbiology*. **35**: 275-288.
- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W. e Formal, S.B. (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*. **226**: 694-696.
- Ojeniyi, B., Ahrens, P. e Meyling, A. (1994). Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *Journal of Veterinary Medicine B*. **41**: 49-59.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A. (2000). Typing of intimina genes in human and animal enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimina variant. *Infection and Immunity*. **68**: 64-71:
- Padhye, N.V. e Doyle, M.P. (1991). Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157:H7 and O26:H11. *Journal of Clinical Microbiology*. **29**: 99-103.
- Padhye, N.V. e Doyle, M.P. (1992). *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*. **55**: 555-565.
- Paton, A.W. e Paton, J.C. (1998a). Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 598-602.
- Paton, J.C. e Paton, A.W. (1998b). Patogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. **11**: 450-479.

- Paul, M., Tsukamoto, T., Ghosh, A.R., Bhattacharya, S.K., Manna, B., Chakrabarti, S., Nair, G.B., Sack, D.A., Sen, D. e Takeda, Y. (1994). The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. *FEMS Microbiology Letters*. **117**: 319-325.
- Peiffer, I., Servin, A.L. e Bernet-Camard, M.F. (1998). Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. *Infection and Immunity*. **66**: 4036-4042.
- Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. e Blattner, F.R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. **409**: 529-533.
- Perry, L., Heard, P., Kane, M., Kim, H., Savikhin, S., Domínguez, W. e Applegate, B. (2007). Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*. **15**: 176-198.
- Petri, W.A., Miller, M., Binder, H.J., Levine, M.M., Dillingham, R. e Guerrant, R.L. (2008). Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *The Journal of Clinical Investigation*. **118**: 1277-1290.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. e Klein, D.A. (2005). *Microbiology*. 6ª Edição. International Edition. McGraw – Hill. EUA.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A. e Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 2355-2360.
- Pupo, G.M., Lan, R. e Reeves, P.R. (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **97**: 10567-10572.
- Ramachandran, V., Brett, K., Homitzky, M.A., Dowton, M., Beltelheim, K.A., Walker, M.J., Djordjevic, S.P. (2003) Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**: 5022-5032;

- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. e Swerdlow, D.L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*. **11**: 603-609.
- Razzaq, S. (2006). Hemolytic uremic syndrome: an emerging health risk. *American Family Physician*. **74**: 991-996.
- Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S.A., Hii, J., McEwen, S. e Gyles, C.L. (1992). Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Molecular and Cellular Probes*. **6**: 153-161.
- Reddy, B.S., MacFie, J., Gatt, M., Macfarlane-Smith, L., Bitzopoulou, K. e Snelling, A.M. (2007). Commensal bacteria do translocate across the intestinal barrier in surgical patients. *Clinical Nutrition*. **26**: 208-215.
- Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da Comunidade Europeia* L 322/12.
- Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da Comunidade Europeia* L 338/1.
- Regulamento (CE) nº 365/2010 da Comissão, de 28 de Abril de 2010, altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, no que diz respeito a *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a *Listeria monocytogenes* no sal alimentar. *Jornal Oficial da Comunidade Europeia* L 197/9.
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K. e Whittam, T.S. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*. **406**: 64-67.
- Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L. e Molin, S. (2006). In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *Journal of Bacteriology*. **188**: 3572-3581.
- Roberts, P.H., Davis, K.C., Garstka, W.R. e Bhunia, A.K. (2001). Lactate dehydrogenase release assay from vero cells to distinguish verotoxin producing *Escherichia coli* from non-verotoxin producing strains. *Journal of Microbiological Methods*. **43**: 171-181.
- Rocelle, M., Clavero, S. e Beuchat, L.R. (1996). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and

- suitability of media for its recovery. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 2735-2740.
- Roche. (2006). *Cytotoxicity detection kit<sup>PLUS</sup> (LDH)*. Versão 4.0. Acedido a 2 de Setembro de 2011, em: <http://www.roche-applied-science.com>.
- Russo, T.A. e Johnson, J.R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*. **181**: 1753-1754.
- Ryu, J.H., Deng, Y., e Beuchat, L.R. (1999). Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids. *Journal of Food Protection*. **62**: 451-455.
- Salter, M.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. e McMeekin, T.A. (2000). Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology*. **61**: 159-167.
- Sandvig, K. e Van Deurs B. (1994). Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. *FEBS Letters*. **346**: 99-102.
- Sansonetti, P. (2002). Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut Journal*. **50**: S2-S8.
- Sansonetti, P.J. (1992). Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **180**: 1-19.
- Sansonetti, P.J., Phalipon, A. Arondel, J., Thirumalai, K., Banerjee, S., Akira, S., Takeda, K. e Zychlinsky, A. (2000). Caspase-1 activation of IL-1b and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity*. **12**: 581-590.
- Santos, M.I., Correia, C., Cunha, M.I.C. Saraiva, M.M e Novais, M.R. (2000). *Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração*. INSA, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. CSAN, Centro de Segurança Alimentar e Nutrição. Perspectivas. Lisboa.
- Sauvage, F.J., Horuk, R., Bennett, G., Quan, C., Burnier, J.P. e Goeddel. (1992). Characterization of the recombinant human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**: 6479-6482.

- Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C. e Levine, M.M. (1991). Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *The Journal of Clinical Investigation*. **87**: 1450-1455.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S. e Guerry, P. (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **90**: 3093-3097.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Molina, J., Cravioto, A., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M. e Fasano, A. (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*. **173**: 1019-1022.
- Scaletsky, I.C., Silva, M.L. e Trabulsi, L.R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity*. **45**: 534-536.
- Schmidt, H., Karch, H. e Beutin, L. (1994). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiology Letters*. **117**: 189-196.
- Sears, C.L. e Kaper, J.B. (1996). Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews*. **60**: 167-215.
- Sheutz, F. e Caprioli, A. (2011). VTEC O104:H4 strain characteristics. Em: *Annual FWD Network Meeting*. Roma. 27 e 28 de Outubro de 2011. European Centre For Disease Prevention and Control (ECDC) e European Food Safety Authority (EFSA).
- Shouwan, T., Liang, K., Junjie, O. e Hanfa, Z. (2006). Adsorption of endotoxin on polymixin B immobilized affinity matrices. *Chinese journal of analytical chemistry*. **34 (4)**: 455-458.
- Siegler, R.L., Obrig, T.G., Pysher, T.J., Tesh, V.L., Denkers, N.D. e Taylor, F.B. (2003). Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology Journal*. **18**: 92-96.
- Sixma, T.K., Kalk, K.H., van Zanten, B.A., Dauter, Z., Kingma, J., Witholt, B. e Hol, W.G. (1993). Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *Journal of Molecular Biology*. **230**: 890-918.
- Spangler, B.D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxina. **56**: 622-647.

- Streatfield, S.J., Sandkvist, M., Sixma, T.K., Bagdasarian, M., Hol, W.G.J. e Hirst, T.R. (1992). Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **89**: 12140-12144.
- Sweeney, N.J., Klemm, P., McCormick, B.A., Moller-Nielsen, E., Utley, M., Schembri, M.A., Laux, D.C. e Cohen, P.S. (1996). The *Escherichia coli* K-12 *gntP* gene allows *E. coli* F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infection and Immunity*. **64**: 3497-3503.
- Tarr, C.L. e Whittam, S. (2002)., Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **184**: 479-487;
- Tarr, P.I., Gordon, C.A. e Chandler, W.L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. **365**: 1073-1986.
- Tauschek, M., Gorrell, R. J., Strugnell, R.A. e Robins-Browne, R.M. (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxins by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **99**: 7066-7071.
- Teneberg, S., Hirst, T.R., Angström, J. e Karlsson K.A. (1994). Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. *Glycoconjugate Journal*. **11**: 533-540.
- Tesh, V.L., Burris, J.A., Owens, J.W., Gordon, V.M., Wadolkowski, E.A., O'Brien, A.D. e Samuel, J.E. (1993). Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infection and Immunity*. **61**: 3392-3402.
- Tieng, V., Le Bouguénec, C., Du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D. e Toubert, A. (2002). Binding of *Escherichia coli* adhesion AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *PNAS*. **99**: 2977-2982.
- Tobe, T., Hayashi, T., Han, C.G, Schoolnik, G.K., Ohtsubo, E. e Sasakawa, C. (1999). Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infection and Immunity*. **67**: 5455-5462.
- Trabulsi, L.R., Keller, R. e Tardelli, G.T.A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases Journal*. **8**: 508-513.
- Tsalie, E., Kouzi, K., Poutahidis, T., Abas, Z., Sarris, K., Iliadis, N. e Kaldrymidou, E. (2006). Effect of vitamin E nutritional supplementation on the pathological changes induced

- in the ileum of rabbits by experimental infection with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Comparative Pathology*. **134**: 308-319.
- Turner, S.M., Scott-Tucker, A., Cooper, L.M. e Henderson, I.R. (2006). Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **263**: 10-20.
- Tzschoppe, M., Martin, A. e Beutin, L. (2012). A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O194:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. **152**: 19-30.
- Ugrinovich, L.A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D.L., Silveira, W.D., Pestana de Castro, A.F. (2007). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. **115**: 297-306;
- Uyttendaele, M., Van Boxtael, S. e Debevere, J. (1999). PCR assay for Detection of the *E. coli* O157:H7 *eae*-gene and effect of the sample preparation method on PCR detection of heat-killed *E. coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*. **52**: 85-95.
- Vaandrager, A.B., Van der Wiel, E., Hom, M.L., Luthjens, L.H. e Jonge, H.R. (1994). Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**: 16409-16415.
- Valdivieso-Garcia, A., Clarke, R.C., Rahn, K., Durette, A., MacLeod, D.L. e Gyles, C.L. (1993). Neutral red assay for measurement of quantitative vero cell cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 1981-1983.
- Vallance, B.A. e Finlay, B.B. (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **97**: 8799-8806.
- Varma, J.K., Greene, K., Reller, M.E., DeLong, S.M., Trottier, J., Nowicki, S.F., DiOrio, M., Koch, E.M., Bannerman, T.L., York, S.T., Lambert-Fair, M.A., Wells, J.G. e Mead, P.S. (2003). An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA*. **290**: 2709-2712.



- Vasselon, T., Mounier, J., Hellio, R. e Sansonetti, P.J. (1992). Movement along actin filaments of the perijunctional area and de novo polymerization of cellular actin are required for *Shigella flexneri* colonization of epithelial Caco-2 cell monolayers. *Infection and Immunity*. **60**: 1031-1040.
- Wales, A.D., Pearson, G.R., Roe, J.M., Hayes, C.M., La Ragione, R.M. e Woodward, M.J. (2005). Attaching-effacing lesions associated with *Escherichia coli* O157:H7 and other bacteria in experimentally infected conventional neonatal goats. *Journal of Comparative Pathology*. **132**: 185-194.
- Wang, N., He, M. e Shi, H.C. (2007). Novel indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to detect total *E. coli* in water environment. *Analytica Chimica Acta*. **590**: 224-231.
- Wang, R.F., Cao, W.W. e Cerniglia, C.E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*. **83**: 727-736.
- Weiss-Muszkat, M., Shakh. D., Zhou, Y., Pinto, R., Belausov, E., Chapman, M.R. e Sela, S. (2010). Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**: 1545-1554.
- Wells, J.G., Davis, I.K., Wachsmuth, L.W., Reily, L.W., Remis, R.S., Sokolow, R. e Morris, G.K. (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *Journal of Clinical Microbiology*. **18**: 512-520.
- WHO, World Health Organization. (2011). Outbreaks of *E. coli* O104:H4 infection: update 30. Acedido em 3 de Março de 2021, em: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>.
- Williams, C.A. e Chase, M.W. (1976). Stabilizes cell membranes and preserves cell morphology. *Methods in Immunology and Immunochemistry*. **5**: 386-395.
- Willshaw, G.A., Scotland, S.M., Smith, H.R., Cheasty, T., Thomas, A., Rowe, B. (1994). Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a vero cytotoxin-producing strain of *E. coli* O157. *Journal of Clinical Microbiology*. **32**: 897-902.
- Wilson, R.A. e Francis, D.H. (1986). Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *American Journal of Veterinary Research*. **47**: 213-217.

- Wolf, M.K. (1997). Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. **10**: 569-584.
- Wood, P.K., Morris, J.G., Small, P.L., Sethabutr, O., Toledo, M.R., Trabulsi, L. e Kaper, J.B. (1986). Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. **24**: 498-500.
- Woodward, M.J., Kearsley, R., Wray, C. e Roeder, P.L. (1990). DNA probes for the detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in cattle and pigs. *Veterinary Microbiology*. **22**: 277-290.
- Yamamoto, T. e Echeverria, P. (1996). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infection and Immunity*. **64**: 1441-1445.
- Yu, G., Niu, J., Shen, M., Shao, H. e Che, L. (2006). Detection of *Escherichia coli* O157 using equal-length double-stranded fluorescence probe in a real-time polymerase chain reaction assay. *Clinica Chimica Acta*. **366**: 281-286.
- Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T. e Karch, H. (2002a). Identification, characterization, and distribution of Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 1441-1446.
- Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suervaum, S., Schmidt, H. (2002b). Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 4486-4492;
- Zhao, T. e Doyle, M.P. (1994). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *Journal of Food Protection*. **57**: 780-783.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., Larossa, R.A. e Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*. **183**: 4562-4567.
- Zychlinsky, A., Prevost, M.C. e Sansonetti, P.J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. **358**: 167-169.

## ANEXOS

**Anexo I – Alinhamento das sequências dos *primers* EAE23F e EAE25R com a sequência do gene *eae* presente nas estirpes *E. coli* TW14359 e EC4115**

**Sequência parcial do gene *eae* em *E. coli* EC4115 e TW14359**

(5' para 3')

1441 agaaagaata tcctgcttct tgtactccag aataatattg ttattacgct gaaccagatc

**EAE23F forward primer**

1501 gtaacggctg cctgataatg ttcttaactc gttaacatac tgtgggttcaa ttgctgaga

1561 ccacgattta tcaaactgat aacggaactg cattgagtaa aggagatcat tttcattacc

1621 cgtaccatga cggtaatcga tccccatcgt caccagagga atcgagatgat agtttacacc

1681 aacggtcgcc gcaccaggat tcgactgcag cttatcagaa ttaaacaag caacattatc

1741 accataatac tgctcatata tcagcttggc gcctaatagcc ggatatgacg gtagatagcc

1801 attaaaacgg atatcgaagc catttgctgg gcgctcatca tagtctttct tattgtatga

1861 ctcatgccag ccgctcatgc ggaaatagcc gttacgcta cttttgaaat agtctcgcca

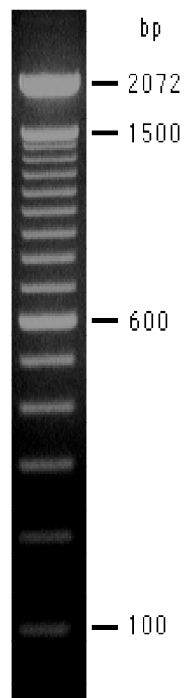
1921 gtattcgcca ccaataccta aacgggtatt atcaccagaa aaatcctgat caatgaagac

1981 gttatagccc aacatgtttg caggaaggaa aaaacgctga cccgcaccta aatttgccgt

**EAE25R reverse primer**

(NCBI, 2011)

## Anexo II – Marcadores moleculares utilizados no Multiplex PCR

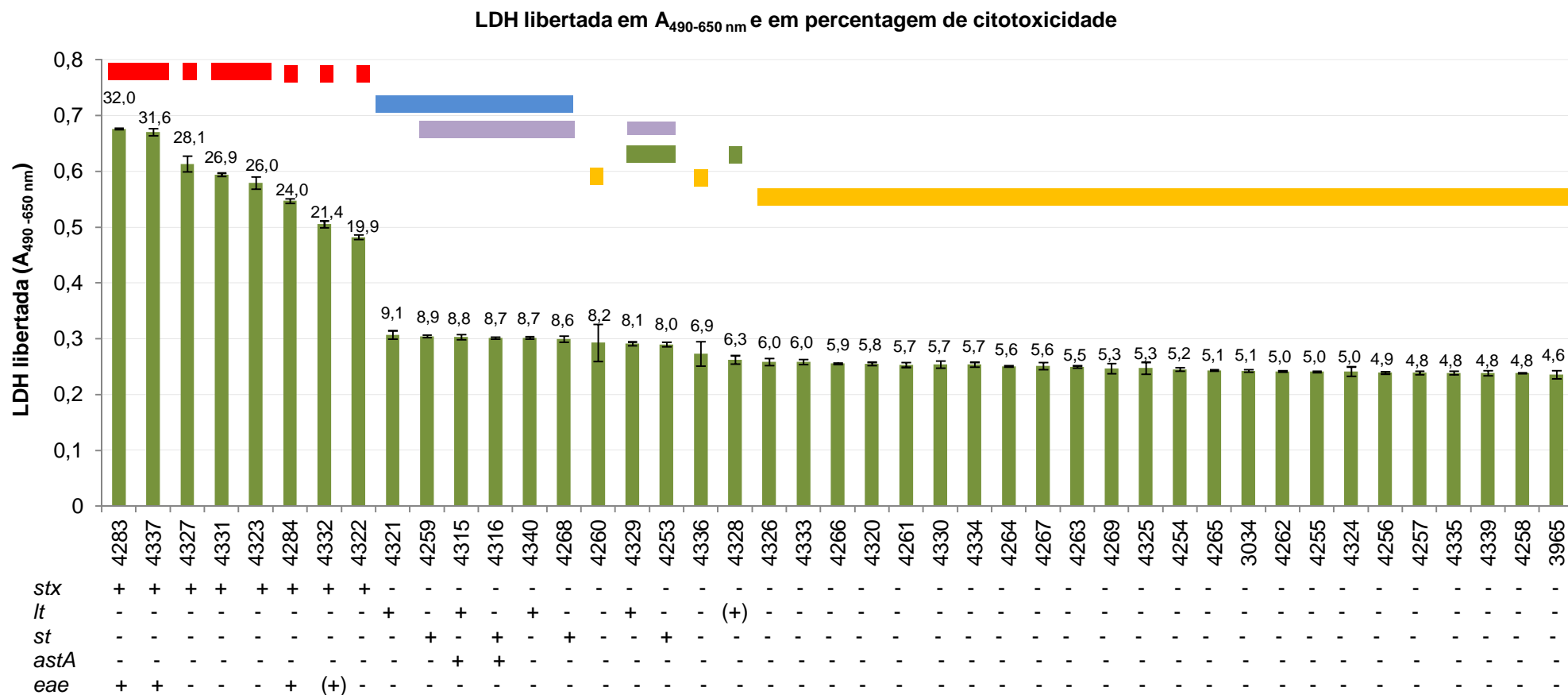


Marcador 100 bp DNA Ladder



Marcador 1 Kb plus DNA Ladder

**Anexo III – Representação gráfica dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade para detetar a virulência de isolados de *E. coli* usando células Vero, em A<sub>490-650 nm</sub> e em percentagem e Multiplex PCR**



Esta representação gráfica foi efectuada com base nos dados do quadro 10 (para melhor entendimento dos resultados deve ser consultada a legenda do quadro). Os valores médios de LDH libertada, em A<sub>490-650 nm</sub>, que estão marcadas com as mesmas cores não são significativamente diferentes (considerando que  $p \leq 0,05$  é indicador de significância estatística). Os valores de LDH expressos em percentagem de citotoxicidade encontram-se representados por cima da barra correspondente do valor de LDH medido em A<sub>490-650 nm</sub>.